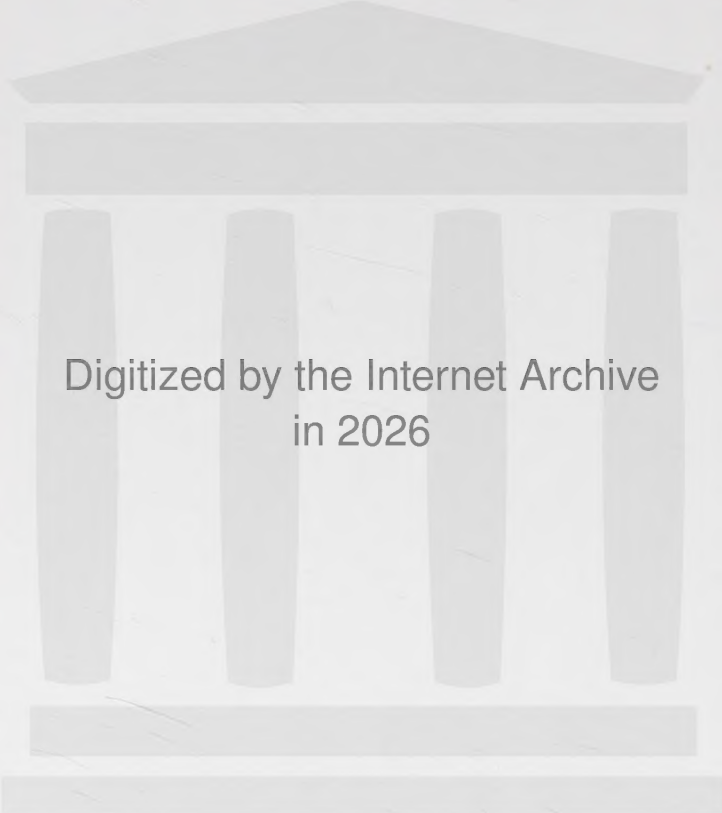


**Versuche zur Anwendung der radioimmunologischen
Östrogenbestimmung im Rahmen der
Rückstandsanalytik bei Masttieren**

Hans Jürgen Behr

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554606_0004

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Versuche zur Anwendung der radioimmunologischen
Östrogenbestimmung im Rahmen der Rückstandsanalytik
bei Masttieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Hans Jürgen Behr
aus Aussig

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. H. Karg

Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 22. Februar 1974

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Vorbemerkung.....	1
2. Literaturteil.....	2
2.1. Charakterisierung der Östrogene.....	2
2.1.1. Definition der östrogenen Wirkung.....	2
2.1.2. Östrogenwirksame Verbindungsklassen.....	3
2.1.2.1. Steroidöstrogene.....	3
2.1.2.2. Stilbene.....	7
2.1.2.3. Phyto- und Mykoöstrogene.....	8
2.1.3. Bedeutung der chemischen Struktur für die Ver- stoffwechselung und die östrogene Wirksamkeit der einzelnen Verbindungsklassen.....	11
2.2. Verwendung von Östrogenen in der Tiermast.....	14
2.2.1. Physiologische Grundlagen der Östrogenmast.....	14
2.2.2. Durchführung der Östrogenmast.....	15
2.2.3. Gesetzliche Situation und hygienische Aspekte der Östrogenmast.....	19
2.3. Untersuchungen zur Erfassung endogener und exogener Östrogene beim Kalb.....	20
3. Methodischer Teil.....	24
3.1. Östrogenmessungen.....	24
3.1.1. Möglichkeiten zur Messung von Östrogenen.....	24
3.1.1.1. Biologische Verfahren.....	24
3.1.1.2. Chemisch-physikalische Meßverfahren.....	24
3.1.1.3. Biochemische Methoden.....	25
3.1.2. Verwendetes radioimmunologisches Bestimmungs- verfahren.....	26
3.1.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Steroidhormonbestimmung.....	26

	Seite
3.1.2.2. Verwendete Antisera.....	28
3.1.2.2.1. Antiserum zur Bestimmung der Gesamtöstrogene.....	29
3.1.2.2.2. Antiserum zur Bestimmung von Östron.....	32
3.1.2.2.3. Antiserum zur Bestimmung von Östradiol-17B.....	34
3.1.2.3. Durchführung des Radioimmunotests.....	36
3.1.3. Vorbereitung der Proben für den radio- immunologischen Test.....	39
3.1.3.1. Extraktion von Plasma und Follikel- flüssigkeit.....	39
3.1.3.2. Hydrolyse und Extraktion von Urin.....	39
3.1.3.3. Extraktionsgang für Muskelgewebe.....	40
3.1.3.3.1. Vorversuche zur Aufarbeitung von Muskelgewebeprobe.....	40
3.1.3.3.2. Endgültiger Aufarbeitungs- gang.....	41
3.1.3.3.2.1. Homogenisation und interne Standardisierung.....	41
3.1.3.3.2.2. Ätherextraktion.....	42
3.1.3.3.2.3. Gewinnung der phenolischen Fraktion.....	42
3.1.3.3.2.4. Säulenchromatographie.....	44
3.1.3.3.2.5. Berechnung der Wieder- findung.....	45
3.1.4. Beurteilung der angewandten Bestimmungs- verfahren.....	46
3.1.4.1. Zuverlässigkeitskriterien.....	46
3.1.4.2. Methodenvergleich mit einem fluori- metrischen Verfahren.....	52
3.1.5. Erfassung der Radioaktivität.....	53
3.1.6. Verwendete Reagentien und Materialien.....	54
3.2. Bestimmung von Kreatinin.....	56
3.3. Statistik.....	57

4. Tierversuche und Ergebnisse.....	58
4.1. Ergebnisse bei Anwendung der beschriebenen Verfahren im Rahmen eines Modellversuches bei zwei weiblichen Mastkälbern.....	58
4.1.1. Durchführung des Tierversuchs.....	58
4.1.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung.....	58
4.1.1.2. Behandlung der Tiere und Probengewinnung	58
4.1.2. Vergleich der Lebendgewichte beider Kälber..... zu Versuchsbeginn und Versuchsende.....	60
4.1.3. Ergebnisse der Östrogenbestimmung im Plasma.....	61
4.1.4. Ergebnisse der Östrogenbestimmung im Urin.....	63
4.1.5. Ergebnisse der Östrogenbestimmung in der Follikelflüssigkeit.....	69
4.1.6. Ergebnisse der Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β im Muskelgewebe.....	70
4.2. Ergebnisse stichprobenartiger Untersuchungen von Muskelproben von zwei graviden Kalbinnen.....	71
4.2.1. Fleischprobe einer Kalbin aus dem 2. Graviditäts- trimester.....	71
4.2.2. Fleischprobe einer Kalbin aus der Endphase der Gravidität.....	72
4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse im Muskelgewebe.....	73
5. Diskussion.....	75
5.1. Diskussion der Methodik.....	75
5.2. Diskussion der Ergebnisse.....	78
5.3. Allgemeine Diskussion.....	82
6. Zusammenfassung.....	85
Summary.....	87
7. Literaturverzeichnis.....	89
Lebenslauf	

1. V o r b e m e r k u n g

In der letzten Zeit ist die Kritik an der illegalen Verwendung von östrogenen Hormonen in der tierischen Produktion im Zuge eines wachsenden Umweltbewußtseins der Bevölkerung wieder verstärkt ins Blickfeld gerückt.

Im Gegensatz zu vielfach in der Publizistik geäußerten Bedenken gegen diesen Östrogeneinsatz mangelt es noch an wissenschaftlich fundierten Untersuchungen über mögliche Folgeerscheinungen beim Verbraucher. Mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden war es wohl möglich, nach Verabreichung eines Östrogenhaltigen Präparates die Östrogenausscheidung über Urin und Faeces zu verfolgen, sowie in unmittelbarer Umgebung der Implantations- bzw. Injektionsstelle Östrogene noch nachzuweisen. Schwierigkeiten tauchten aber bei der Beurteilung der durch neue analytische Methoden zugänglich gewordenen, früher subschwellig vorhandenen, Östrogenrückstände auf, die in Bereichen zu quantifizieren waren, in denen auch Hormonrückstände körpereigener Provenienz zu erwarten sind.

Mit vorliegender Arbeit sollte durch Anwendung eines neu entwickelten, hochempfindlichen und spezifischen radioimmunologischen Verfahrens ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Verteilung und möglichen Akkumulation von verabreichten Östrogenpräparaten im tierischen Organismus geleistet werden. Mit dieser Methode scheint es außerdem erstmals möglich zu sein, zur Abgrenzung auch die endogenen Östrogene bei nicht behandelten juvenilen Tieren zu messen.

2. L i t e r a t u r t e i l

2.1. Charakterisierung der Östrogene

2.1.1. Definition der östrogenen Wirkung

Östrogene sind eine Vielzahl unterschiedlicher, chemisch klar definierter Verbindungen, die sich durch eine einheitliche, spezifische biologische Wirkung auszeichnen. Aufgrund dieser spezifischen biologischen Wirkung können die Östrogene allgemein als Stoffe definiert werden, die beim weiblichen Individuum an den sekundären Geschlechtsorganen charakteristische, mit Brunstsymptomen einhergehende Veränderungen hervorrufen.

Dabei ist für das Verweilen und die nachhaltige Wirkung von Östrogenen an bestimmten Organen das Vorhandensein östrogenbindender Zell-Rezeptor-Proteine entscheidend (JUNGBLUT et al. 1969; KORENMAN 1970; KORENMAN & DUKE 1970; SUTHERLAND 1972). Diese Rezeptorproteine können aus den Erfolgsorganen, z.B. dem Uterus, isoliert werden.

Nachdem es gelungen ist, aus den Zellen des Endometriums einen spezifischen, uterinen, zytoplasmatischen Östrogenrezeptor zu isolieren und näher zu charakterisieren (JENSEN et al. 1969), kann für die Gruppe der östrogenwirksamen Stoffe eine noch spezifischere Definition gegeben werden: demnach handelt es sich dabei um Verbindungen, die in der Lage sind, Bindungsstellen am uterinen Östrogenrezeptor zu besetzen, wodurch dann die entsprechenden biochemischen und physiologischen Veränderungen eingeleitet werden. Mit Hilfe dieser uterinen Östrogenrezeptoren scheint es erstmals möglich zu sein, auch in einem definierten "in vitro"-System die östrogene Wirksamkeit bestimmter Verbindungen zu erfassen, wie dies in Versuchen von KORENMAN (1969), ELLIS (1970) sowie KYREIN et al. (1973) gezeigt werden konnte.

2.1.2. Östrogenwirksame Verbindungsklassen

Entsprechend der unterschiedlichen chemischen Struktur bzw. ihrer Herkunft lassen sich die östrogenwirksamen Stoffe in drei Verbindungsklassen einteilen: Steroidöstrogene, Stilbene, Phyto- und Mykoöstrogene.

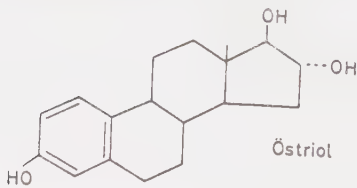
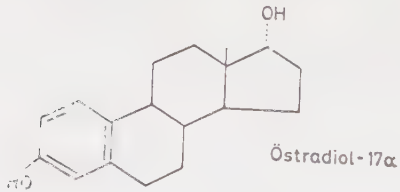
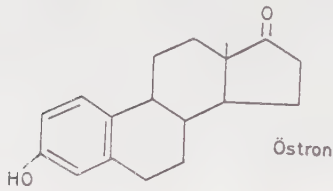
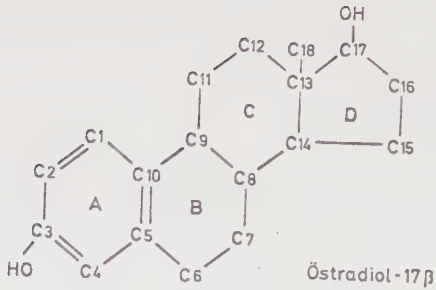
2.1.2.1. Steroidöstrogene

Die Steroidöstrogene gehören zur großen Gruppe der hormonalen Steroide; es handelt sich also um endogene, d.h. körpereigene Verbindungen. Sie leiten sich in ihrer chemischen Struktur vom Steran (Cyclopentanoperhydrophenantren) ab und sind durch 18 Kohlenstoffatome im Molekül und durch einen einheitlichen phenolischen A-Ring ausgezeichnet. Die einzelnen Östrogene unterscheiden sich lediglich durch Zahl und Anordnung der funktionellen Gruppen (Keto- und Hydroxylgruppen), speziell im sogenannten D-Ring. Die wichtigsten Östrogene sind, entsprechend der Reihenfolge ihrer biologischen Wirksamkeit, Östradiol-17 β , Östron, Östradiol-17 α und Östriol. Die Strukturformeln dieser endogenen Östrogene sind in Abb. Nr. 1 dargestellt, wobei die Numerierung der C-Atome und die Bezeichnung der Ringe am Beispiel von Östradiol -17 β angegeben ist.

Die Biosynthese der Östrogene verläuft, ausgehend vom aktivierten Acetyl-CoA, über das Cholesterin, Pregnenolon, Progesteron, 17 α -OH-Progesteron und Androstendion. Man spricht auch vom sog. " Δ 4-Syntheseweg", da alle durchlaufenen Zwischenstufen einen ungesättigten A-Ring mit einer Doppelbindung von C4 nach C5 besitzen (SHORT 1962).

Abb. 1

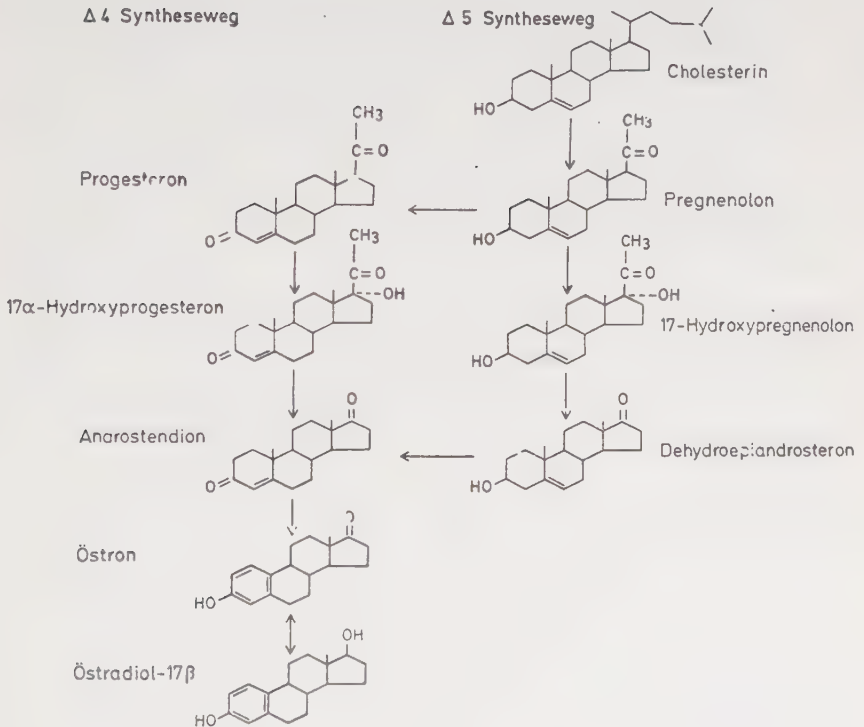
Endogene Östrogene



Weiterhin gibt es den sog. " $\Delta 5$ -Syntheseweg", der ebenfalls über die Zwischenstufen Cholesterin und Pregnenolon verläuft, dann aber 17-OH-Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron als Zwischenprodukte aufweist. Die Einmündung in den " $\Delta 4$ -Syntheseweg" geschieht auch hier über die Zwischenstufe Androstendion. Beide Synthesewege wurden von ABRAHAM und TAIT (1971) zusammenfassend dargestellt. Sie sind aus Abb. Nr. 2 zu ersehen.

Abb. 2

Biosynthese der Östrogene
(nach ABRAHAM & TAIT 1971)



Die oben dargelegte Östrogensynthese vollzieht sich in erster Linie im Ovar, in geringerem Umfang aber in allen anderen steroidhormonbildenden Organen.

Die weitere Wirkungsentfaltung der Östrogene verläuft im Säugetierorganismus im physiologischen Falle in klar vorgezeichneten Bahnen. Nach Abgabe in das Kreislaufsystem liegen die Östrogene beim Transport zum Erfolgsorgan entweder in freier Form vor, oder sie sind mit bestimmten Plasmaproteinen assoziiert. Dieser Bindung an Plasmaproteine kommt neben einer reinen Vehikelfunktion, wobei insbesondere die Albumine angesprochen sind, wohl auch eine spezifischere biologische Bedeutung zu, die vielleicht mit einer Pufferwirkung erklärt werden kann. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß Glucocorticoide (MILLS et al. 1960; SLAUNWHITE et al. 1962) und Progesteron (WESTPHAL & FORBES 1963; W. HOFFMANN et al. 1969), die an spezifische Plasmaproteine (Globuline) gebunden sind, keine biologische Aktivität aufweisen. Ein entsprechendes spezifisches Plasmarezeptorprotein, das sogenannte SBP (Sex Steroid Binding Plasma Protein), konnte auch für Östradiol-17 β nachgewiesen werden (MURPHY 1968; MERCIER-BODARD et al. 1970). Diese Bindung an SBP ist reversibel, wobei die Bereitstellung von SBP von physiologischen Zuständen, z.B. der Gravidität abhängig ist (WESTPHAL 1971). Was nun die Menge der an Plasmaproteine gebundenen Östrogene betrifft, so wurde festgestellt, daß etwa zwei Drittel der im Blut vorhandenen Östrogene mit Plasmaproteinen assoziiert sind (ROBERTS & SZEGO 1946, 1953, 1955; SZEGO & ROBERTS 1946, 1953). Eine zusätzliche Interpretation über die Funktion von SBP geben die Untersuchungen von BURKE & ANDERSON (1972). Nach ihren Beobachtungen kommt diesem Plasmaprotein eine entscheidende Rolle bei der Einhaltung des biologischen Gleichgewichts zwischen Testosteron und Östradiol bei der Frau zu.

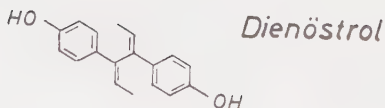
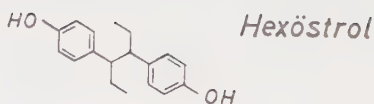
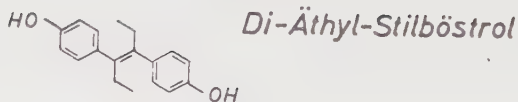
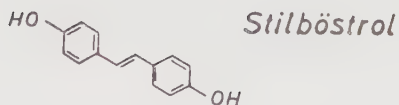
Der Abbau der Östrogene im Organismus erfolgt einmal durch Inaktivierung der biologisch hochaktiven Östrogene (Östradiol-17 β) in weniger aktive Formen, z.B. in Östradiol-17a bei der Spezies Rind (MELLIN et al. 1965; MELLIN & ERB 1965, 1966) und zum andern auch durch Veresterung in der Leber mit Glukuronsäure und Sulfatresten, wonach sie in wasserlöslicher Form vorliegen und schnell über Faeces und Urin ausgeschieden werden können (GANONG 1965; EL-ATTAR & TURNER 1957).

2.1.2.2. Stilbene

Als zweite östrogenwirksame Verbindungsklasse sind neben den Steroidöstrogenen die sog. Stilbene anzuführen. Es handelt sich um Verbindungen, die normalerweise nicht im Körper vorkommen, somit also um "synthetische oder exogene" Östrogene. Sie wurden erstmals von DODDS et al. (1938) beschrieben. Diesem gelang es, nach Veränderung des Stilbenmoleküls (= Diphenyläthylen) durch Einführung von zwei Hydroxylgruppen und durch Ersatz von zwei Wasserstoffatomen der Äthylenbrücke durch Äthylgruppen, eine Verbindung darzustellen, welche die biologischen Wirkungen der endogenen Östrogene vollständig nachahmte. Diese neue Verbindung wurde Diäthylstilböstrol (DÄS) genannt. Neben DÄS gibt es noch weitere Stilbenderivate mit östrogener Wirkung, wobei insbesondere Dienöstrol und Hexöstrol anzuführen sind. Die Strukturformeln von Stilböstrol sowie der drei erwähnten Stilbenderivate sind in Abb. Nr. 3 aufgeführt.

Abb. 3

Stilbenderivate



2.1.2.3. Phyto- und Mykoöstrogene

Auf das Vorkommen östrogenwirksamer Substanzen in Pflanzen wiesen bereits 1926 LOEWE & SPOHR sowie DOHRN et al. (1926) hin. Diese östrogenwirksamen Substanzen werden allgemein als Phytoöstrogene bezeichnet. Es handelt sich um eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Verbindungen. Teilweise sind sie steroidaler Natur; so

isolierten BUTENANDT & JAKOBI (1933) Östron aus Palmkernschrot und SKARZYNSKI (1933) isolierte Östriol aus den Blüten von Weidenkätzchen. In der Knolle von *Butea Superba*, einer in Siam als Aphrodisiakum bekannten Schlingpflanze, fand man das sog. Miröstrol (WALKER & JANNEY 1930; BUTENANDT & JAKOBI 1940; JONES & POPE 1960). Häufiger als die Phytoöstrogene steroidaler Natur sind Verbindungen verbreitet, die sich von den Isoflavonen oder von Cumarinabkömmlingen ableiten. Gemeinsam mit den anderen östrogenwirksamen Verbindungen weisen auch diese Verbindungen phenolische OH-Gruppen auf. Zu den Isoflavonen zählen das Genistein, Biochanin A, Daidzein, Formononetin und Prateinsein (CURNOW et al. 1948; CURNOW 1954; CURNOW & ROSSITER 1955; ROBINSON 1949; BECK & BRADEN 1951; BRADBURY & WHITE 1951, 1954).

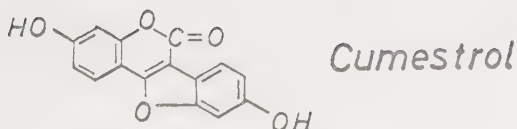
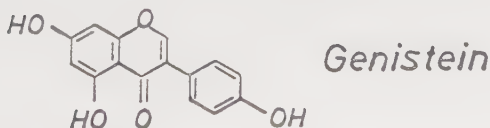
Bekanntester Cumarinabkömmling ist das Cumestrol (BICKOFF et al. 1957, 1958; BICKOFF 1961).

Am häufigsten finden sich diese Phytoöstrogene in bestimmten Kleearten, z.B. *Trifolium subterraneum*.

Die Strukturformeln der bekanntesten Vertreter (Genistein und Cumestrol) sind in Abb. Nr. 4 dargestellt.

Abb. 4

Struktur der Phytoöstrogene Genistein und Cumestrol

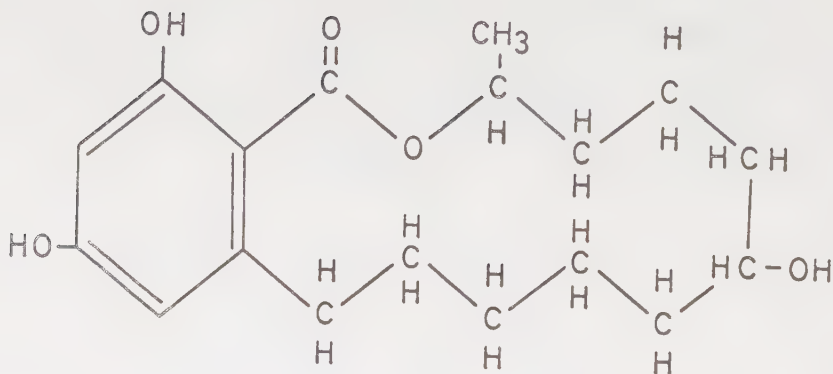


Wohl bekanntester Abkömmling der Mykoöstrogene ist das Zeranol. Es ist ein Resorcylsäurelaktone, das synthetisch aus einem Metaboliten des Maisschimmelpilzes *Gibberella zeae* hergestellt wird (STOB et al. 1962; PERRY et al. 1969).

In Abb. Nr. 5 ist die Strukturformel für Zeranol dargestellt.

Abb. 5

Struktur des Mykoöstrogens Zeranol



2.1.3. Bedeutung der chemischen Struktur für die Verstoffwechselung und die östrogene Wirksamkeit der einzelnen Verbindungsklassen

Nachdem im vorherigen Kapitel die drei Östrogenwirksamen Verbindungsklassen vorgestellt wurden, soll kurz auf die aus den unterschiedlichen chemischen Strukturen resultierenden Besonderheiten in der Verstoffwechselung im Säugetierorganismus eingegangen werden. Hier kann zunächst grundsätzlich festgestellt werden, daß lediglich die Steroidöstrogene als körpereigen angesprochen werden können, während Stilbene sowie Phyto- und Mykoöstrogene - soweit es eben den Säugetierorganismus betrifft - als absolute Fremdstoffe zu betrachten sind, wenn sie nicht Steroide sind.

Wenn nun einem Säugetierorganismus exogen Steroidöstrogene zugeführt werden, so werden diese Verbindungen sofort in die in Kapitel 2.1.2.1. dargelegten Stoffwechselwege eingeführt, da ja der Organismus nicht zwischen einem endogen produzierten und einem exogen zugeführten Steroidöströgen unterscheiden kann. Mit einer schnellen Inaktivierung exogen zugeführter Steroidöstrogene ist besonders nach peroraler Applikation zu rechnen, da ja die Verbindung nach Resorption aus dem Darm über den Pfortaderkreislauf einer Leberpassage unterworfen wird, wobei der größte Teil der resorbierten Steroidöstrogene durch Konjugation mit Glukuronsäure und Sulfatresten inaktiviert wird. Peroral zugeführte Steroidöstrogene zeichnen sich auf Grund dieser Tatsache nur durch eine geringe biologische Wirksamkeit aus. Bei parenteraler Zufuhr dagegen, bei der die Leberpassage auf indirektem Wege erfolgt, kann mit einer größeren biologischen Wirksamkeit gerechnet werden.

Anders als bei Zufuhr von Steroidöstrogenen sind für zugeführte Stilbenöstrogene, Phyto- und Mykoöstrogene keine bestimmten Stoffwechselwege eingerichtet; die spezifische Enzymausstattung, die zu einer Katalyse und schnellen Veresterung notwendig wäre, fehlt. Nach peroraler Aufnahme dieser Verbindungen werden diese nach Passage durch die Leber wieder zum großen Teil in freier Form über die Galle in das Darmlumen ausgeschieden, von wo sie dann erneut

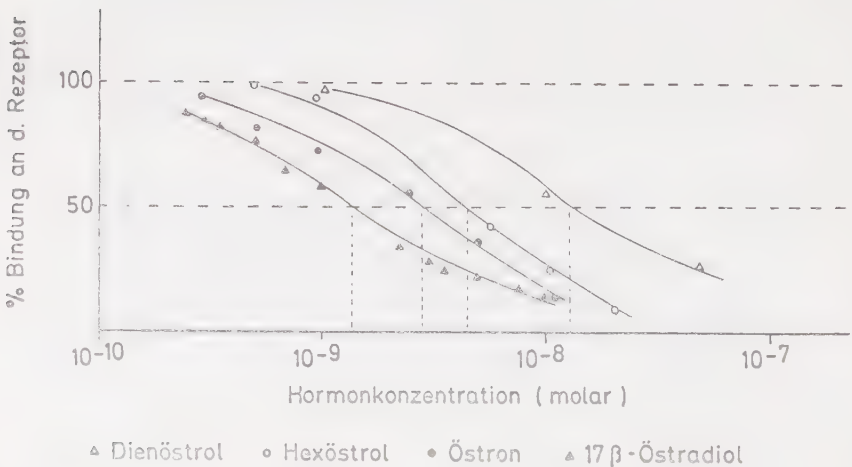
resorbiert werden können. Das Verhalten der Stilbene sowie der Phyto- und Mykoöstrogene im Säugetierorganismus ist also durch diesen stark ausgeprägten, enterohepatischen Kreislauf ausgezeichnet (GLASCOCK & SMITH 1970). Daraus ergibt sich eine längere Verweildauer im Organismus, wodurch die gute orale Wirksamkeit dieser Verbindungen erklärt werden kann.

Die Bedeutung der Applikationsform und der Verstoffwechselung für die biologische Wirksamkeit eines Östrogenpräparates wird durch die folgende Gegenüberstellung verdeutlicht:

Im "in vitro" Test, in der Größenordnung von 10^{-8} molar, weist Östron eine etwa ähnliche, geringgradig höhere Affinität zum uterinen zytoplasmatischen Östrogenrezeptor im Vergleich zu Dienöstrol auf. In Abb. Nr. 6 sind die Affinitäten von Dienöstrol und Östron zum uterinen zytoplasmatischen Östrogenrezeptor dargestellt; zum Vergleich wird auch die Bindungsaffinität von Hexöstrol und Östradiol-17 β mit angegeben (KYREIN et al. 1973).

Abb. 6

Bindung der Östrogene Östron und Dienöstrol an den uterinen zytoplasmatischen Östrogenrezeptor im "in vitro" Test



Nach peroraler Verabreichung an ovariectomierte weibliche Ratten dagegen - das Hormon gelangt also nicht direkt zum Erfolgsorgan - zeigen sich deutliche Wirkungsunterschiede (gemessen an der Gewichtszunahme des Uterus). In Tabelle Nr. 1 wird dieser Unterschied durch Zahlenangaben verdeutlicht.

Tabelle 1

Uterotrope Wirkung von Östron und Dienöstron nach
Verabreichung im biologischen Rattentest
(nach HUIS IN'T VELD et al. 1971)

ng/g Diät	Uterus = Gewicht/100 g Körpergewicht	
	Östron	Dienöstron
0	86	87
1	81	104
10	101	181
100	94	390
1000	272	345

Die Wirkung von Östron ist in diesem Testsystem deutlich schwächer als die von Dienöstron.

2.2. Verwendung von Östrogenen in der Tiermast

2.2.1. Physiologische Grundlagen der Östrogenmast

Der anabole Effekt einer Östrogenzufuhr hat zur praktischen Anwendung in der tierischen Produktion geführt. Diese anabole Wirkung zeigt sich am deutlichsten bei kastrierten Tieren (BURROUGHS et al. 1954), was damit erklärt werden kann, daß durch die exogene Hormonzufuhr ein endogenes Hormondefizit (entstanden durch Entfernung der Keimdrüsen) ausgeglichen wird. Bei Jungbullen z.B. werden die Gewichtszunahmen und die Futterverwertung durch Verabreichung von Östrogenen bei weitem nicht in dem Maße verbessert, wie dies bei Ochsen der Fall ist (KLOSTERMAN et al. 1955; BRÜGGEMANN et al. 1958). Auch bei weiblichen geschlechtsreifen Tieren zeigen Östrogenverabreichungen weit geringere Erfolge als bei Ochsen, in manchen Fällen fehlt die Wirkung sogar ganz (GASSNER et al. 1959; BUSH & REUSER 1963; WICKERSHAM & SCHULTZ 1964).

Wie bei Ochsen tritt ein anaboler Effekt auch bei der Verabreichung von Östrogenen an Mastkälber auf, wie vorliegende Versuche gezeigt haben, und wie auch aus derzeit laufenden, größeren Feldversuchen hervorgeht (GROPP 1973). Auch hier kann zur Erklärung der anabolen Wirkung einer exogenen Östrogenzufuhr angeführt werden, daß bei den ja noch nicht geschlechtsreifen Tieren eine endogene Hormonproduktion noch nicht voll angelaufen ist.

Der Effekt einer Östrogenmast ist also vom momentanen Hormonstatus eines Tieres abhängig. Es kann zusammenfassend gesagt werden, daß der Masteffekt dann besonders augenfällig ist, wenn keine oder nur wenig endogene Sexualhormone produziert werden.

Die Frage, auf welchen physiologischen und biochemischen Grundlagen sich die hormonelle Wirkung entfaltet, konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden. Grundsätzlich kann jedoch gesagt werden, daß für die Entfaltung einer hormonellen Wirkung im entsprechenden Erfolgsorgan das Vorhandensein spezifischer, hormonbindender Rezeptoren

notwendig ist (JUNGBLUT et al. 1967). Für die Östrogene sind die uterinen Rezeptoren am besten charakterisiert (siehe Kapitel 2.1.1.). Die Wirkung am Uterus kann jedoch nicht für den Masteffekt verantwortlich sein, da dieser ja gerade bei kastrierten, männlichen Tieren zu beobachten ist. Es ist vielmehr anzunehmen, daß sich die Wirkung der Östrogene durch Beeinflussung hypothalamischer Rezeptoren vollzieht. Östrogenbindende Rezeptoren konnten im Hypothalamus eindeutig nachgewiesen werden (KAHWANAGO et al. 1969; KATO & VILLEE 1967; KATO et al. 1971); worauf allerdings die Wirkung im einzelnen beruht, kann noch nicht gesagt werden - allgemein wird heute eine indirekte Wirkung über das Somatotrope Hormon (Wachstumshormon) angenommen (STRAEMPLER & BURROUGHS 1957; PRESTON & BURROUGHS 1960).

Grundsätzlich kann auch festgestellt werden, daß die oben beschriebene Wirkung der Östrogene dosisabhängig ist; bei zu hohen Dosierungen kommt es zu einem katabolen Effekt (KARG 1958).

2.2.2. Durchführung der Östrogenmast

Geflügel:

Am Anfang der Östrogenmast stand die Erkenntnis, daß eine Verabreichung östrogenwirksamer Substanzen an Mastgeflügel zur Qualitätssteigerung führt (vermehrte intramuskuläre Fetteinlagerung durch gesteigerte Lipogenese, LORENZ 1954).

Ein Antrag an die Food and Drug Administration (FDA) zur Zulassung von Östrogenen als Masthilfsmittel wurde 1947 für die USA genehmigt.

Die Praxis sah zunächst so aus, daß 12 mg DÄS als Implantat am Kopf, hinter dem Kamm, eingesetzt wurden (Bedenken hinsichtlich der Verbrauchergefährdung aufgrund nicht vollständig resorbierten Implantationsmaterials ergaben sich zunächst nicht, da, wegen der Vermarktungsgegebenheiten in den USA, Hühnerköpfe dem menschlichen Genuß entzogen sind).

Ein weiteres, in der Praxis angewandtes Verfahren, ist die Verabreichung von Dienöstroldiacetat im Futter in einer Dosierung von 22 mg/kg Futter.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Anwendung östrogenwirksamer Substanzen zu Mastzwecken in der Geflügelproduktion nie eine große Rolle gespielt hat. Heute wird die Anwendung nur noch für solche Fälle diskutiert, wo eine ganz spezielle Fleischqualität gefordert wird, z.B. im Rahmen der Poulardenerzeugung (siehe auch National Research Council, 1966).

Schaf:

Der Einsatz östrogenwirksamer Substanzen in der Lämmermast wurde vor allem in den USA und in Australien propagiert. Echte Nutzeffekte (Mehrzunahmen zwischen 15 und 22 %; HALE et al. 1955; JORDAN et al. 1955) ergaben sich bei einer Zufütterung von 2 mg DÄS pro Tier und Tag, über einen Zeitraum von 62 Tagen, oder durch eine Implantation von 12 mg DÄS (an der Ohrbasis) 70 Tage vor der Schlachtung.

Statt DÄS kamen auch 15 mg Hexöstro1 als Implantat (PRESTON & GEE 1957) zur Anwendung oder - in Form einer oralen Verabreichung - 4 mg Dienöstro1 pro Tier und Tag (ANDREWS et al. 1956).

Auch Steroidöstrogene werden in Form von Kombinationspräparaten für den praktischen Einsatz vorgeschlagen, z.B. 10 mg Östradiol und 200 mg Progesteron in Form eines Implantates, eine Dosis, die nach TAYLOR et al. (1957) und HENNEMANN et al. (1957) ähnlich gute Wachstumseffekte wie die Anwendung von DÄS ergeben soll. Die Erfolge in der Schafmast sind ähnlich denen beim Rind (MEANS et al. 1953) (s.u.).

Schwein:

Bei Versuchen an Schweinen berichtete BRAUDE (1947), daß die Verfütterung von 50 mg DÄS pro Tier und Tag an junge, kastrierte männliche Schweine zu einem geringen Ansteigen der Wachstumsrate führte. In weiteren Untersuchungen ergab sich jedoch, daß allgemein keine positive Wirkung auf das Wachstum festgestellt werden konnte (BEESON et al. 1955; TAYLOR et al. 1955; SEWELL et al. 1957; DINUSSON et al. 1951; MURPHREE et al. 1951; WOEHLING et al. 1951; PEARSON et al. 1952).

Zusammenfassend kann festgestellt werden (GASSNER et al. 1959), daß die Anwendung von Östrogenpräparaten in der Schweinemast in der Praxis zu keinen positiven Ergebnissen führte. Heute wird nur noch in England bei Mastschweinen ein Kombinationspräparat aus Methyltestosteron und DÄS verwendet.

Rind:

Die größte Verbreitung fand der Östrogeneinsatz zu Mastzwecken in der Rinderhaltung. Die praktische Anwendung begann 1954 in den USA mit der Genehmigung durch die Food and Drug Administration, DÄS in der Rindermast anzuwenden.

Gesteigerte Mastleistungen (13 - 18 % mehr Nutzeffekt im Vergleich zu Kontrollen) ergaben sich aus einer Dosierung von 10 mg DÄS pro Tier und Tag bei Aufnahme mit dem Futter über einen Zeitraum von ca. 120 Tagen bis 48 Stunden vor der Schlachtung (BURROUGHS et al. 1954, 1955; BEESON et al. 1956), oder aus einer einmaligen Implantation von 24 bzw. 36 mg DÄS 120 Tage vor der Schlachtung (DINUSSON et al. 1950; CLEGG & COLE 1954).

DÄS wurde 1973 in den USA verboten, weil man aufgrund verbesserter Meßverfahren Rückstände in Leber und Niere festgestellt hatte. Bereits BARTH & KARG (1960) wiesen darauf hin, daß es zur Bildung von Rückständen kommen kann, insbesondere bei nicht

rechtzeitigem Absetzen vor dem Schlachten.

Als weiteres Stilbenpräparat kommt, hauptsächlich in England, Hexöströl zur Anwendung. Es wird entweder in einer Dosierung von 60 mg in Form von Pellets subkutan an der Ohrbasis 90 Tage vor der Schlachtung implantiert, oder es wird oral in einer Dosis von 10 mg pro Tier und Tag, ca. 90 Tage lang, verabreicht (KILKENNY & SUTHERLAND 1970).

Ähnlich wie beim Schaf hat auch beim Rind der Einsatz von Steroidöstrogenen als Masthilfsmittel eine weite Verbreitung gefunden; so werden als Implantate die Kombinationen Östradiol bzw. Östradiolbenzoat und Progesteron für das männliche, und männliche kastrierte Tier, und Östradiol bzw. Östradiolbenzoat und Testosteron für das weibliche Tier verwendet.

Ein weiteres Anabolikum ist das Mykoöstrogen Zeranol, dessen Anwendung in einer Dosierung von 36 mg vom Hersteller empfohlen wird; verabreicht wird Zeranol, ebenfalls in Form von Pellets, subkutan am Ohrgrund.

Ebenfalls auf den Markt gekommen ist das Kombinationspräparat Revalor, das sich aus den Verbindungen Östradiol (20 mg) und Trenbolonazetat (140 mg) zusammensetzt.

Die bisher angegebenen Dosierungen und Anwendungsvorschriften beziehen sich in erster Linie auf die Tierhaltung in den USA (Feedlot Cattle).

Grundsätzlich werden jedoch die gleichen Masthilfsmittel in Europa verwendet.

Auf die gesetzlichen Grundlagen wird im nächsten Kapitel eingegangen.

2.2.3. Gesetzliche Situation und hygienische Aspekte der Östrogenmast

Praktikabilität und echter Nutzeffekt der Östrogenmast sind also bei vielen Spezies erwiesen. Im Sinne eines Verbraucherschutzes haben die Gesetzgeber in den einzelnen Ländern bestimmte Richtlinien hinsichtlich der Anwendung von Östrogenen in der Tierproduktion erlassen.

Eindeutig ist die Situation in der BRD; hier ist durch §4b Absatz 2 des Lebensmittelgesetzes die Anwendung von Substanzen mit östrogener Wirkung, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beeinflussen, verboten.

In den USA wurde die Situation differenzierter gehandhabt; dort war bis 1972 die Verfütterung von DÄS nach dem in Kapitel 2.2.2. angegebenen Schema zugelassen, nämlich nach Implantation durfte frühestens 120 Tage später geschlachtet werden, bzw. bei Verfütterung von DÄS betrug die Absetzzeit 48 Stunden vor der Schlachtung. Nach dem Verbot der oralen Anwendung von DÄS in den USA im Frühjahr 1973 wurde auch die Implantation von DÄS im Sommer 1973 verboten. Im Augenblick ist noch die geregelte Anwendung von Steroidöstrogenen und von Zeranol erlaubt.

Der Grundgedanke des Verbotes der Anwendung von Östrogenen liegt darin, daß der Verbraucher vor möglichen Rückständen in den zum Verzehr geeigneten Tierkörperbestandteilen geschützt werden soll.

Das Problem der Rückstandsfreiheit ist aber in unmittelbarem Zusammenhang mit der Empfindlichkeit der angewandten Methodik zu sehen. So konnte mit zunehmender Erhöhung der Meßempfindlichkeit der angewandten Verfahren gezeigt werden, daß Applikationsarten, von denen man bisher annahm, sie würden keine Rückstände bilden, doch zu einer gewissen Rückstandsbildung führten. Hierauf sind die in letzter Zeit in den USA erlassenen, gesetzlichen Verbote zurückzuführen (siehe auch Kapitel 2.2.2.).

In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, daß allein durch das Verbot der Östrogenmast das Problem nicht gelöst werden kann. Besonders für Europa ist erwiesen, daß ein grauer Markt weit verbreitet ist. So gibt es Hinweise aus der Praxis, die besagen, daß die Anwendung östrogenwirksamer Substanzen als Masthilfsmittel bei Mastkälbern in der BRD beträchtlich ist; Schätzungen von Fachleuten ergeben, daß 40 bis 50 % aller Mastkälber östrogenbehandelt sind. Diese gegenwärtige Situation zwingt dazu, das Problem der Östrogenanwendung in der tierischen Produktion neu zu überdenken. Die im Vordergrund stehende Frage des Verbraucherschutzes hinsichtlich möglicher Rückstandsbildungen - bisher war man ja vielfach auf reine Spekulationen angewiesen - kann nur durch exakte Untersuchungen mit neu entwickelten, hochempfindlichen Methoden geklärt werden, wobei auch die endogenen, vom Tier selbst produzierten Hormone mit erfasst werden müssen, zumindest bei Verwendung von Steroidöstrogenen als Masthilfsmittel.

2.3. Untersuchungen zur Erfassung endogener und exogener Östrogene beim Kalb

Im Gegensatz zur Situation beim erwachsenen Rind liegen allgemein für die Entwicklungsphase des neugeborenen und des heranwachsenden Rindes nur sehr wenig Angaben über endogen produzierte Sexualhormone vor.

Im Jahre 1958 (a, b,c) berichtet VELLE über den Stoffwechsel und die Ausscheidung von Östrogenen Substanzen beim Kalb, wobei als Bestimmungsmethode das von BROWN (1955) beschriebene, photometrische Verfahren zur Anwendung kam.

Im Urin neugeborener Kälber fand VELLE (1958 b) Östron und Östradiol-17a; die durchschnittliche Ausscheidung betrug dabei für Östron bei männlichen Kälbern 0,23 mg/24 Std. und bei weiblichen Kälbern 0,24 mg/24 Std.; für Östradiol-17a ergaben sich für männliche Kälber 3,3 mg/24 Std. und für weibliche Kälber 2,3 mg/24 Std.;

diese Zahlen beziehen sich auf die Ausscheidung während der ersten fünf Lebenstage; danach sinkt die Ausscheidung rapide ab. Über die Herkunft dieser endogenen Östrogene läßt sich keine gültige Aussage machen, teilweise wird eine gewisse Eigenproduktion für möglich gehalten (durch die Nebennierenrinde) und teilweise wird angenommen, daß maternale Östrogene im Fötus gespeichert und nach der Geburt ausgeschieden werden.

Neben der Ausscheidung von Östrogenen im Urin wurde von VELLE (1958 b) auch Östradiol-17a im Mekonium neugeborener Kälber nachgewiesen.

Nach exogener Verabreichung von Östradiol-17B an Kälber beobachtete VELLE (1958 c) bei Messungen im Urin, daß eine Umwandlung zu Östron und Östradiol-17a stattfindet.

Nach Verabreichung von Östron fand VELLE (1958 a) als hauptsächlichstes Ausscheidungsprodukt Östradiol-17a.

Dieser Stoffwechselmechanismus, nämlich die Umwandlung von Östradiol-17B zu Östron und dieses wieder zu Östradiol-17a gilt nach VELLE's Meinung speziell für die Spezies Rind.

Inzwischen konnte gezeigt werden, daß die Umwandlung von Östron zu Östradiol-17a im wesentlichen im peripheren Blut stattfindet, wie sich aus Inkubationsstudien mit peripherem Rinderblut ergab (WILLIAMS et al. 1968).

Bei Rückstandsuntersuchungen auf Östrogene bei zwei männlichen Kälbern, denen 20 mg Östradiolbenzoat und 200 mg Progesteron als Implantat i.m. (Kalb I) bzw. s.c. (Kalb II) verabreicht worden waren, fanden VOGT et al. (1972) beim 1. Tier eine Östradiol-17B Ausscheidung im Urin von 1 µg/24 Std. (Beginn der Urinsammlung 5 Std. nach der Implantation) und von 187 µg/24 Std. (am 15. Tag nach der Implantation); beim 2. Tier lagen die Ausscheidungswerte bei 3 µg/24 Std. (Beginn der Urinsammlung 6 Std. nach der Implantation) und bei 54 µg/24 Std. (am 9. Tag nach der Implantation).

Im Gewebe konnte lediglich nach intramuskulärer Implantation in unmittelbarer Umgebung der Implantationsstelle ein positiver Östrogennachweis geführt werden. So lag die Konzentration in einem Abstand von 0 - 5 cm von der Implantationsstelle bei 30 μg Östradiol/kg Muskelgewebe; in einem Abstand von 5 - 15 cm von der Implantationsstelle lag die Konzentration bei 0,7 μg Östradiol/kg Muskelgewebe. Bei Vergrößerung des Abstandes reichte die Empfindlichkeit der angewandten Methodik (photometrische Messungen) nicht mehr aus, um positive Messungen durchführen zu können.

Weiterhin konnten KARG et al. (1972 b) bei Rückstandsuntersuchungen bei einem nichtbehandelten Kalb (= Kontrolle) ab der 4. bis zur 12. Woche eine steigende Gesamtöstrogenausscheidungsrate mit einem radioimmunologischen Meßverfahren im Urin feststellen, was auf eine bereits vorhandene eigene Östrogenproduktion hinweist. In vorliegender Arbeit wird hierauf noch ausführlich eingegangen werden.

Ähnliche Verhältnisse wie bei der Verabreichung von Steroid-östrogenen werden auch nach Gabe von Stilbenpräparaten an Kälber gefunden.

Die Ausscheidung von DÄS in Kot und Urin untersuchten KARG et al. (1970), wobei sowohl eine biologische als auch eine fluorimetrische Untersuchungsmethode verwendet wurde. Es konnten jeweils klare Ausscheidungskurven erstellt werden. Bei Untersuchungen im Gewebe ergaben sich nur in der Umgebung der Injektionsstelle positive Ergebnisse, sowohl bei Anwendung des biologischen Tests (Mäuseuterus-Test), als auch bei Anwendung eines chemischen Verfahrens (Fluoreszenzmessung).

In ähnlichen Untersuchungen stellten HUIS IN'T VELD et al. (1967; 1969 a, b) fest, daß östrogene Substanzen in Kot und Urin nach Verabreichung nachgewiesen werden konnten; im Gewebe dagegen gelang der Nachweis wieder nur in unmittelbarer Umgebung der Injektionsstelle. Eine weitere Substanz, die als Anabolikum in der Tierproduktion ver-

wendet wird, ist das Mykoöstrogen Zeranol (siehe Kapitel 2.1.2.3.). Über Verabreichungsdosis und Ausscheidung beim Rind berichtet BROWN (1973). Bei seinen Untersuchungen, die er mit ^3H -markiertem Zeranol durchführte, konnte er feststellen, daß es bei Implantation in den Ohrgrund praktisch zu keinen Anreicherungen im Gewebe kommt. Die Ausscheidung erfolgt in erster Linie über den Kot und dann erst über den Urin.

3. Methodischer Teil

3.1. Östrogenmessungen

3.1.1. Möglichkeiten zur Messung von Östrogenen

Für die Bestimmung von Östrogenen kommen drei verschiedene Meßprinzipien in Frage: biologische Verfahren, chemisch-physikalische Meßverfahren und biochemische Methoden.

3.1.1.1. Biologische Verfahren

Bei den biologischen Verfahren können Hormone anhand der biologischen Wirkung, die sie in einem bestimmten Versuchstier entfalten, erfaßt werden. Diese Verfahren sind also nur wirkungsspezifisch und nicht substratspezifisch. Aus diesen Gründen, sowie besonders aus Gründen der Empfindlichkeit, schied die Anwendung eines solchen Verfahrens zur Klärung der ausstehenden Fragen von Anfang an aus.

3.1.1.2. Chemisch physikalische Meßverfahren

Sie beruhen darauf, daß bestimmte chemische und physikalische Eigenschaften von Steroidmolekülen zu deren Messung und Identifizierung herangezogen werden. Diese Eigenschaften können nicht in einem einzigen Aufarbeitungs- und Meßvorgang spezifisch erfaßt werden; es ist notwendig, daß bei der Messung eines bestimmten Hormons mehrere Aufarbeitungsschritte durchlaufen werden. Die Zahl der Aufarbeitungsschritte hängt davon ab, wie spezifisch die Messung sein soll, d.h. ob z.B. die Östrogengruppe insgesamt, oder ob einzelne Hormone dieser Gruppe spezifisch erfaßt werden sollen. So umfaßt ein solches Verfahren im allgemeinen eine Extraktion, einen oder mehrere chromatographische Reinigungsschritte und schließlich

die Endmessung. Bei der Endmessung kommen folgende Verfahren in Frage: a) Photometrische Messungen mit Hilfe der Koberfarbreaktion (BAULD 1954; BROWN 1955); hier liegt die Empfindlichkeit im unteren Mikrogrammbereich, oder b) Fluoreszenzmessungen (ITTRICH 1958), deren Empfindlichkeit im oberen Nanogrammbereich liegt. Des weiteren kommen in Frage c) gaschromatographische Bestimmungsverfahren unter Verwendung von Flammenionisationsdetektoren bzw. Elektroneneinfangdetektoren (WOTITZ & MARTIN 1961; ADLERCREUTZ & LUUKAINEN 1965 a, b; WOTITZ et al. 1967; ATTAL & EIK-NES 1968; EBERLEIN 1969). Eine Zusammenfassung dieser Methoden geben O'DONNELL & PREEDY (1967).

d) Ein weiteres Verfahren ist die sog. Doppelisotopenderivat-Verdünnungsmethode (SVENDSEN 1960; BAIRD 1968; KAUTSKY et al. 1970).

Die unter den Punkten c) und d) angesprochenen Verfahren zeichnen sich durch einen sehr hohen Arbeitsaufwand aus. Ein Vorteil dieser Verfahren liegt jedoch in ihrer Spezifität und Empfindlichkeit, die sich im ng-Bereich bewegt. Auf weitere Einzelheiten soll hier nicht näher eingegangen werden, da auch auf den Einsatz solcher Verfahren für die durchzuführenden Untersuchungen von Anfang an verzichtet wurde.

3.1.1.3. Biochemische Methoden

Biochemische Methoden für die Östrogenbestimmung wurden erstmals von TALALAY & MARCUS (1956) sowie von HURLOCK & TALALAY (1957, 1958) beschrieben. Diese enzymatischen Meßverfahren, die auf der Messung von NADH^+ , nach Zugabe von Steroiddehydrogenase zum Substrat, beruhen, haben sich nicht durchgesetzt, da sowohl die Empfindlichkeit als auch die Spezifität nicht den gestellten Ansprüchen gerecht werden konnten (HOFFMANN 1972).

Ein weiteres biochemisches Meßverfahren beruht auf dem Effekt der "Steroid-Proteinbindung". Die grundlegenden Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von MURPHY (1964, 1967) durchgeführt. Diese Verfahren der Proteinbindungsmethoden konnten auch auf den Östrogensektor übertragen werden.

Zur Bestimmung von Östrogenen mit Hilfe der Proteinbindungsmethode wurden bisher 3 unterschiedliche "Bindungsproteine" eingesetzt:

1. das SBP (sex steroid binding plasma protein), 2. uterines Zytoplasma, das sog. "uterine cytosol", ein Rezeptormakromolekül, welches aus dem Uterus verschiedener Spezies gewonnen werden kann (siehe auch Kapitel 2.1.1.), sowie 3. gegen Östrogene gerichtete Antikörper. Eine vergleichende Gegenüberstellung der Methoden bei Verwendung der einzelnen Bindungsproteine gibt HOFFMANN (1972).

Allgemein werden die Verfahren, bei denen Antikörper als Bindungsproteine eingesetzt werden, als radioimmunologische Verfahren (RIT) bezeichnet. Diese Proteinbindungsmethoden haben sich wegen ihrer größeren methodischen Vorteile (geringerer Arbeitsaufwand, große Haltbarkeit der Antikörper, hohe Assoziationskonstante, hohe Empfindlichkeit) durchgesetzt.

Aus diesen Gründen haben wir versucht, von Anfang an ein radioimmunologisches Verfahren zu verwenden.

3.1.2. Verwendetes radioimmunologisches Bestimmungsverfahren

3.1.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Steroidhormonbestimmung

Voraussetzung für die Durchführung eines Radioimmunotests (RIT) ist zunächst die Darstellung geeigneter Antikörper.

Dazu muß gesagt werden, daß Steroidhormone mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich ca. 300 (ENGEL 1963), wie auch andere,

niedermolekulare Verbindungen, ursprünglich keine immunogenen Eigenschaften besitzen. Um eine antigene Wirksamkeit zu erreichen, müssen diese Verbindungen zuvor an hochmolekulare Stoffe, z.B. Proteine gekoppelt werden (s. bei ERLANGER et al. 1957, 1959). Die niedermolekulare Verbindung, hier das Steroid, wirkt dabei als Hapten, d.h., sie bewirkt als determinierende Gruppe des Antigens die Spezifität der Antikörper, die dann nicht nur mit dem Steroid-Protein-Konjugat reagieren, sondern eben auch mit dem freien, nicht konjugierten Steroid (GROSS 1970; GROSS et al. 1971; GOODFRIEND & SEHON 1970). Die Messung beruht auf einer im "in vitro" Ansatz durchgeführten Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch die Verwendung von mit Tritium (^3H) markierten Steroidhormonen als Indikator erfaßt werden kann. Das sich bei dieser Reaktion einstellende Gleichgewicht zwischen Antigen-Antikörperkomplex (gebundene Steroide) und den nicht gebundenen Steroiden (freie Steroide) ist von den Reaktionsbedingungen, insbesondere der Temperatur, abhängig.

Für die Quantifizierung der Reaktion müssen nun die gebundenen von den freien Steroiden getrennt werden. Diese Trennung kann auf verschiedene Weise geschehen: durch Fällung des Proteinanteils mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung und Messung der freien Steroide im Überstand, oder aber durch selektive Adsorption des niedermolekularen Anteils, also der freien Steroide, an spezifische Adsorbentien, wie z.B. Holzkohle, Florisil, oder Fuller Erde.

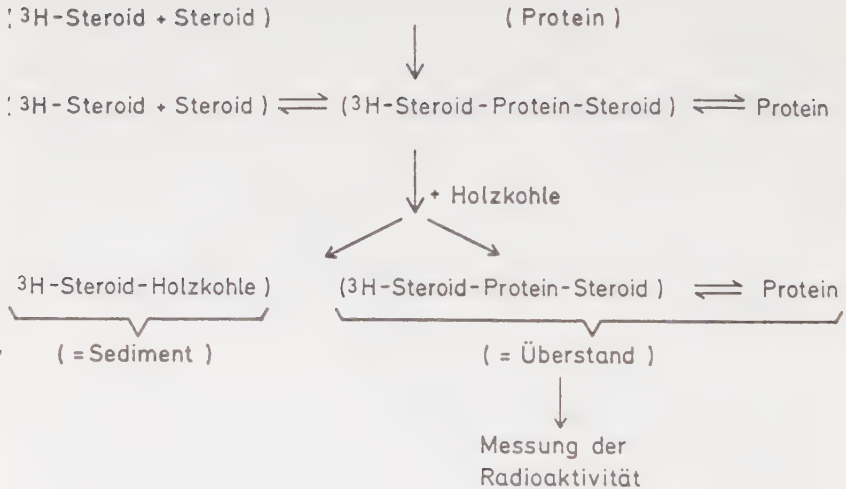
Wird nun eine gleichbleibende Menge ^3H -markierten Steroids bereits vor der Antikörperzugabe mit verschiedenen Mengen des gleichen, nicht markierten Hormons verdünnt (Isotopenverdünnung), so wird, abhängig von den Mengen des nichtmarkierten Steroids, mehr bzw. weniger an markiertem Steroid an den Antikörper nach dessen Zugabe gebunden werden.

Die Bindung von ^3H -markiertem Steroid ist dabei über einen bestimmten Bereich umgekehrt proportional der Menge des zugegebenen, nicht markierten Hormons; nach Erstellung einer Eichkurve können also unbekannte Mengen erfaßt werden.

Das Schema der von uns verwendeten Proteinbindungsreaktion ist in Abb. 7 dargestellt.

Abb. 7

Schema der angewandten Proteinbindungs-
reaktion



3.1.2.2. Verwendete Antisera

Die für vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden Antisera wurden, soweit nicht besonders erwähnt, im hiesigen Institut nach Immunisierung von Kaninchen gewonnen. In den meisten Fällen wurde

die Antigensynthese im gleichen Institut durchgeführt (HOFFMANN 1972; KYREIN 1972 unveröffentlichte Ergebnisse). (Das Antigen zur Gewinnung des Antiserums für die Bestimmung der Gesamtöstrogene wurde in Anlehnung an die 1959 von ERLANGER et al. beschriebene "mixed anhydride"-Reaktion hergestellt, siehe Kapitel 3.1.2.2.1.; das Antigen zur Gewinnung des spezifischen Antiserums gegen Östradiol-17 β wurde ebenfalls im Institut, wie bei LINDNER et al. (1972a, b) und KUSS & GOEBEL (1972 b) angegeben, synthetisiert, siehe auch Kapitel 3.1.2.2.3.).

Die Antisera wurden bis zum Gebrauch in tiefgefrorenem Zustand bei -18°C aufbewahrt.

Vor der Anwendung im RIT wurde jedes Antiserum nochmals auf seine Bindungskapazität und Spezifität überprüft.

Hinsichtlich der Spezifität ist zu sagen, daß diese im wesentlichen von der Art der Koppelung zwischen Steroid und Protein bestimmt wird; grundsätzlich kann gesagt werden, daß die Spezifität steigt, je weniger die funktionellen Gruppen und die Sterie im Steroidmolekül durch die Koppelung beeinflusst werden (NISWENDER & MIDGLEY 1970).

3.1.2.2.1. Antiserum zur Bestimmung der Gesamtöstrogene

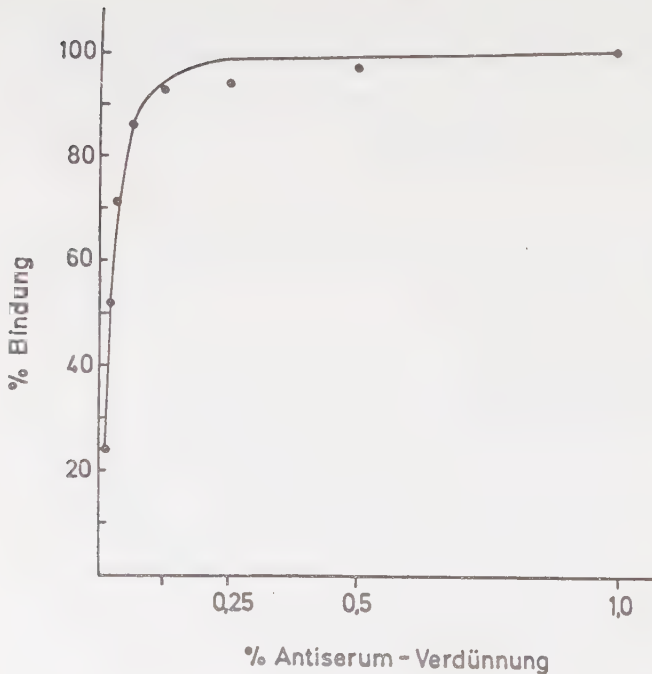
Als Antigen wurde 17 β -Östradiol-17-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin (17 β -Oe2-17HS-RSA) verwendet.

Durch die Koppelung am Kohlenstoffatom C-17 und damit Blockierung der funktionellen Gruppen an C-17, der einzigen Stelle, an der sich die drei wichtigsten endogenen Östrogene Östron, Östradiol-17 β und Östradiol-17a unterscheiden (siehe Kapitel 2.2.1., Abb.Nr. 1), lassen die mit Hilfe dieses Antigens erzeugten Antikörper von Anfang an keine oder nur geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer Affinität zu diesen Östrogenen erwarten.

Für das verwendete Antiserum SE2-E2-AK14 ergab sich bei der Bestimmung der Bindungskapazität, daß bei einer 0,02 %-igen Verdünnung in Phosphatpuffer noch ca. 50% des vorgelegten tritiummarkierten Östradiol-17 β , dementsprechend weiterhin als Vorlage bezeichnet, gebunden wurden, wie auch aus Abb. Nr. 8 hervorgeht.

Abb. 8

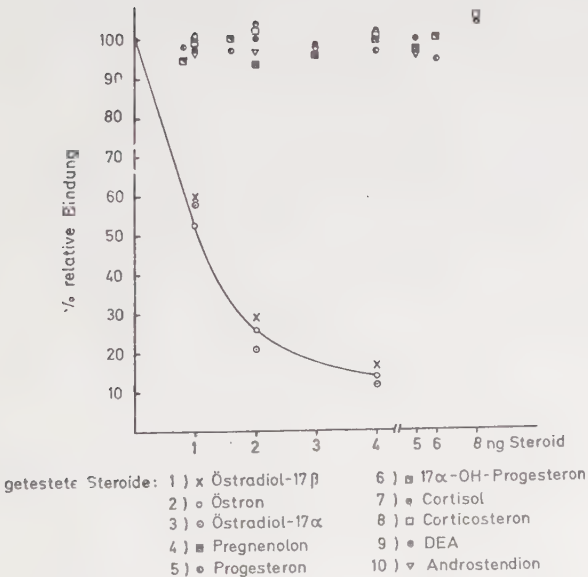
Bestimmung der Bindungskapazität des im RIT verwendeten Antiserums (SE2-E2-AK14) zur Messung von Gesamtöstrogenen.



Die Überprüfung auf Kreuzreaktionen (= Spezifität), d.h., inwieweit andere Steroide mit dem Antiserum Antigen-Antikörper-Reaktionen eingehen, ergab, daß außer mit den Östrogenen Östron, Östradiol-17 β und Östradiol-17 α keine Kreuzreaktionen zu beobachten waren. Als Nicht-Östrogene wurden die Substanzen Pregnenolon, Progesteron, 17 α -OH-Progesteron, Cortisol, Corticosteron, Dehydroepiandrosteron und Androstendion getestet. Das Ergebnis zeigt die Abb. Nr. 9.

Abb. 9

Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit
Antikörpern gegen "17 β -Oe2-17 HS-RSA" (Anti-
serum Nr. SE2-E2-AK14)



Aufgrund dieser Charakteristik erschien das Antiserum zur Messung von Gesamtöstrogenen – also zur gleichzeitigen Messung von Östron, Östradiol-17 β und Östradiol-17 α – geeignet zu sein.

Für die spezifische Erfassung eines einzelnen Östrogens ist, bei Verwendung dieses Antiserums, eine vorausgehende chromatographische Trennung notwendig.

3.1.2.2.2. Antiserum zur Bestimmung von Östron

Dieses Antiserum wurde freundlicherweise von P.D. Dr. E. KUSS, 1. Universitätsfrauenklinik, München, zur Verfügung gestellt. Es trug die Bezeichnung "AS 436 Kuss". Zur Gewinnung von Antikörpern wurde als Antigen Östron-6(O-carboxymethyl)-oxim-RSA (E1-6CMO-RSA) verwendet.

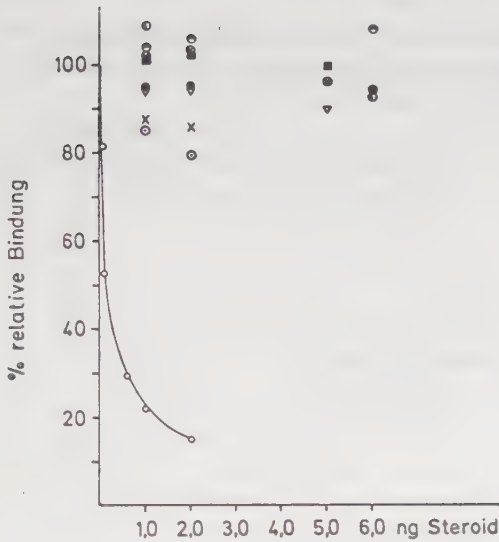
Bei diesem Antigen fand die Koppelung zwischen Steroid und Protein am Kohlenstoffatom C-6 statt, wobei die beiden funktionellen Gruppen im A- und D-Ring unbeeinflusst blieben. Aus diesem Grund lassen die mit diesem Antigen gewonnenen Antikörper von Anfang an eine höhere Spezifität erwarten. Koppelungen an der C-6-Position wurden von EXLEY et al. (1971), LINDNER et al. (1970, 1972 a, b), sowie von KUSS & GOEBEL (1972a, b) vorgeschlagen.

Die von KUSS angegebene, hohe Spezifität des Antiserums gegenüber Östron konnte auch von uns bestätigt werden, wie aus Abb. 10 hervorgeht. Für Versuchszwecke wurde es mit Phosphatpuffer auf 0,007 % verdünnt.

23 pg ^3H -Östron wurden bei dieser Verdünnung im RIT zu 50 % gebunden.

Abb. 10

Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit Antikörpern
gegen "E1-6CMO-RSA" (Antiserum "AS 436 KUSS")



getestete Steroide:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1) x Östradiol-17β | 6) o Cortisol |
| 2) o Östron | 7) ● DEA |
| 3) o Östradiol-17α | 8) ▼ Androstendion |
| 4) ■ Pregnenolon | 9) ● Testosteron |
| 5) o Progesteron | |

3.1.2.2.3. Antiserum zur Bestimmung von Östradiol-17B

Dieses Antiserum, das die Bezeichnung SE1-E2-AK16 trug, stammte wieder aus dem eigenen Labor.

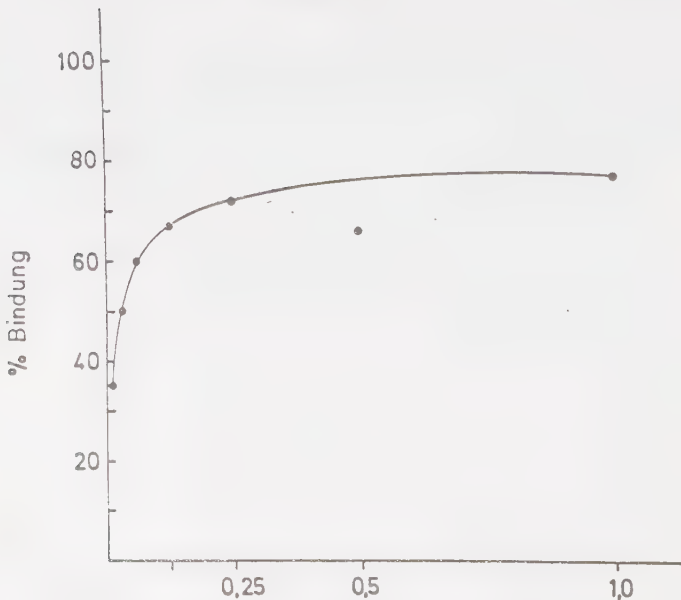
Als Antigen wurde 17B-Östradiol-6(O-carboxymethyl)-oxim-Rinderserum-albumin (17B-Oe2-GCMO-RSA) verwendet, das, wie bei LINDNER et al. (1972 a, b) und KUSS & GOEBEL (1972 b) angegeben, synthetisiert wurde (siehe auch Kapitel 3.1.2.2.).

Auch dieses Antiserum läßt aufgrund der Koppelungsstelle am Kohlenstoffatom C6 zwischen Steroid und Protein im Antigen eine erhöhte Spezifität gegenüber Östradiol-17B erwarten.

Für Versuchszwecke wurde dieses Antiserum mit Phosphatpuffer auf 0,02 % verdünnt. Bei dieser Verdünnung wurden 28 pg ^3H -Östradiol-17B noch zu ca. 50 % gebunden; siehe Abb. Nr. 11.

Abb. 11

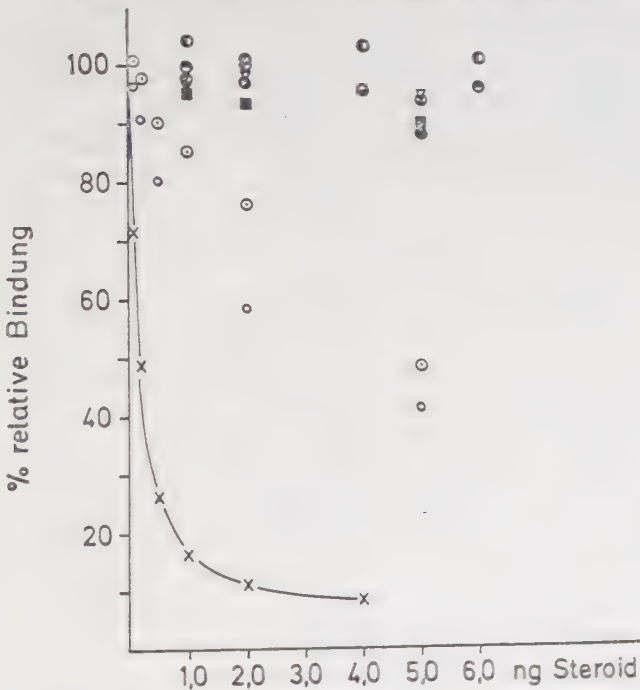
Bestimmung der Bindungskapazität des im RIT verwendeten Antiserums (SE1-E2-AK16) zur Messung von Östradiol-17B



Die Überprüfung auf Kreuzreaktionen ergab, daß das erhaltene Antiserum eine maximale Affinität zu Östradiol-17 β besaß, gegenüber Östron und Östradiol-17 α war die Affinität deutlich niedriger. Kreuzreaktionen mit nichtphenolischen Steroiden wurden nicht gemessen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. Nr. 12 dargestellt.

Abb. 12

Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit Antikörpern gegen "17 β -Oe2-6CMO-RSA" (Antiserum Nr. SE1-E2-AK16)



getestete Steroide:

- | | |
|----------------------------|--------------------|
| 1) x Östradiol-17 β | 6) ● Cortisol |
| 2) o Östron | 7) ● DEA |
| 3) o Östradiol-17 α | 8) ▽ Androstendion |
| 4) ■ Pregnenolon | 9) ● Testosteron |

3.1.2.3. Durchführung des Radioimmunotests

Die Durchführung des RIT geschah, abgesehen von kleinen Modifikationen, nach dem bei HOFFMANN (1972 a) angegebenen Schema.

Die für den RIT vorbereiteten biologischen Proben wurden im Stickstoffstrom bei 40°C niedergetrocknet, hierauf wurden 0,1 ml Phosphatpuffer zugegeben.

Gleichzeitig wurden zur Erstellung einer Standardkurve in bereitgestellte Einwegreagenzgläser je 0,1 ml Phosphatpuffer, worin in einer aufsteigenden Reihenfolge 0,0; 0,06; 0,1; 0,2; 0,6; 1,0 bzw. 2,0 ng Östrogen gelöst waren, im Doppelansatz einpipettiert. Zu allen Proben wurde nun die Vorlage, d.h. ca. 20 000 dpm ^3H -Östron bzw. ^3H -Östradiol-17 β , gelöst in 0,1 ml Phosphatpuffer, und dann 0,5 ml der entsprechenden Antiserumverdünnung, zugegeben.

Die Proben wurden 'en bloc' im Reagenzglasgestell kurz geschüttelt und in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Nach 7 Minuten wurde jede Probe an einem "Vortexmixer" kurz geschüttelt um eine vollständige Lösung und Verteilung zu garantieren. Die Proben wurden dann für weitere 7 Minuten ins Wasserbad zurückgestellt.

Es folgte nun eine einstündige Inkubation im Eisbad.

Anschließend wurden die gebundenen von den freien Steroiden durch Zugabe von 0,5 ml einer gut gerührten und auf 4°C gekühlten Holzkohlensuspension getrennt (s. Kap. 3.1.6.).

Die Proben wurden dann gemeinsam im Gestell 1 Minute lang gut geschüttelt, nochmals 5 Minuten ins Eisbad gestellt und dann 15 Minuten lang bei 2000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Ein ml des Überstandes, der die an die Antikörper gebundenen Steroide enthielt, wurde zur Messung der Radioaktivität in eine Zählküvette, die bereits 10 ml BRAY'S-solution enthielt, verbracht und an einem Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen (siehe auch Kapitel 3.1.5.). Es wurde darauf geachtet, daß eine Probenserie stets den gleichen Zählbedingungen unterworfen wurde.

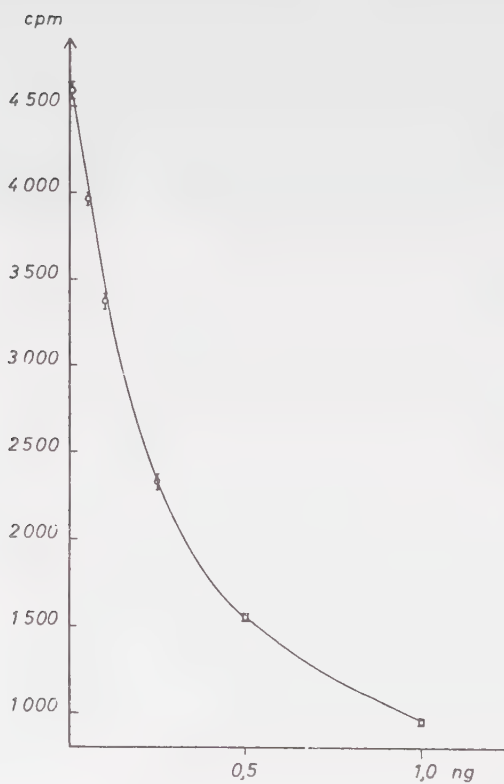
Die Zahl der Proben, die gleichzeitig für einen RIT angesetzt werden konnte, war durch die Kapazität der zur Verfügung stehenden Kühlzentrifuge begrenzt; so konnten im Rahmen vorliegender Versuche maximal 48 Proben auf einmal bearbeitet werden.

Die Quantifizierung der in den einzelnen biologischen Proben vorhandenen Östrogenmengen erfolgte durch die 2 gleichzeitig mit angesetzten Standardkurven, deren Mittelwerte mit Spannweitender Doppelbestimmung für jeden Test graphisch dargestellt wurden. Bei dieser Darstellung wurden auf der Abszisse ng Östrogen und auf der Ordinate die gemessenen cpm aufgetragen. Eine solche Standardkurve für Östradiol-17B ist in Abb. Nr. 13 dargestellt.

Der aus der jeweiligen Standardkurve abgelesene Wert wurde dann mit dem entsprechenden Wiederfindungsfaktor korrigiert (siehe Kapitel 3.3.3.2.5.) und der Östrogengehalt in ng Östrogen/ml Plasma bzw. Urin, oder in ng Östrogen/g Muskelgewebe angegeben.

Abb. 13

Östradiol-17 β -Standardkurve bei Anwendung
des Radioimmunotestes



3.1.3. Vorbereitung der Proben für den radioimmunologischen Test

3.1.3.1. Extraktion von Plasma und Follikelflüssigkeit

Sie erfolgte wie von HOFFMANN (1972 a) angegeben:

Zur Bestimmung der Gesamtöstrogene im Plasma wurde 1 ml Plasma dreimal mit 2 ml Äther pro narcosi extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden im Stickstoffstrom bei 40°C niedergetrocknet, 1,0 ml Aqua bidest. wurde zugegeben und dreimal wurde mit 2,0 ml Äther pro narcosi rückextrahiert. Die im Einwegreagenzglas vereinigten Ätherextrakte wurden erneut im Stickstoffstrom niedergetrocknet und für den RIT verwendet.

Die Follikelflüssigkeit wurde genau so extrahiert, mußte zuvor jedoch wegen der hohen Östrogenkonzentration mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt werden.

3.1.3.2. Hydrolyse und Extraktion von Urin

Da Steroidhormone in Urin und Faeces in wasserlöslicher Form, d.h. als Glucuronsäurekonjugate und als Sulfate vorliegen (GANONG 1965), müssen sie für die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und schließlich auch für den RIT hydrolysiert werden. Speziell für die Östrogene gilt, daß bei der Hydrolyse bei Verwendung von Säuren oder Laugen das Östrogenmolekül angegriffen wird (ERB et al. 1968). Deshalb wurde für vorliegende Untersuchungen die enzymatische Hydrolyse vorgezogen.

Für die Durchführung der Hydrolyse wurden 10 ml einer Urinprobe mit 10 %-iger Orthophosphorsäure, die tropfenweise aus einer Bürette zugegeben wurde, auf pH 4,8 eingestellt. Anschließend wurden 1 ml 1 m Acetatpuffer (pH 4,8) und 0,03 ml Schneckensaft, der die Enzyme

Glucuronidase und Sulfatase enthielt, zugegeben. Das Endvolumen jeder Probe wurde protokolliert. Die Proben wurden dann 16 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Extraktion von Urin entsprach der von Plasma. Lediglich das Ausgangsvolumen schwankte hier entsprechend den zu erwartenden Östrogenmengen zwischen 0,1 und 0,2 ml Hydrolysat, wobei der tatsächliche Urinanteil über das festgehaltene Endvolumen der Probe (s.o.) berechnet wurde. Wie im Plasma wurden auch im Urin die Gesamtöstrogene bestimmt.

3.1.3.3. Extraktionsgang für Muskelgewebe

3.1.3.3.1. Vorversuche zur Aufarbeitung von Muskelgewebeproben

Um Konzentrationen von Steroidhormonen in Geweben erfassen zu können, müssen die Gewebeproben zuerst soweit zerkleinert werden, daß ihre Zellstruktur zerstört wird und das Steroid extrahiert werden kann.

Für eine solche Homogenisierung standen zwei Geräte zur Verfügung, ein Potter (Fa. Brand) und ein Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel).

Bei Verwendung des Potters (ein Gerät, bei dem das Gewebe durch rotierende Bewegungen eines in einem Glaszylinder eingepaßten Kolbens zerkleinert wird) wurde das Gewebe in 2 Vorversuchen einmal in Chloroform und einmal in Aqua bidest. homogenisiert. Beide Male wurde kein befriedigender Zerkleinerungsgrad erreicht. Ein weiterer Nachteil war, daß das Homogenat für den folgenden Aufarbeitungsschritt, nämlich die Extraktion, in ein "Extraktionsglas" (Zentrifugenglas mit Schliff und 30 ml Volumen) übertragen werden mußte, was zusätzliche Aufbereitungsverluste mit sich brachte.

Beim Homogenisieren in Aqua bidest. mit dem Ultra-Turrax (ein stabförmiges Gerät, bei dem ein Messer mit sehr hoher Geschwindigkeit in einem

Metallzylinder rotiert) gelang es, eine gute Zerkleinerung zu erreichen und außerdem konnte die Homogenisierung direkt im "Extraktionsglas" (s.o.) durchgeführt werden.

Diese letztgenannte Methode, Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax in Aqua bidest. direkt im Extraktionsglas, wurde für die weiteren Versuche beibehalten.

Für die nun folgende Extraktion wurde in einem ersten Vorversuch Chloroform als Extraktionsmittel verwendet. Chloroform bildete hier die untere Schicht und konnte nur schlecht abgehebert werden. Trotz dreimaliger Wiederholung dieses Extraktionsschrittes lag die Wiederfindung bei nicht mehr als 20 %, wie die Überprüfung mit radioaktivem Östrogen ergab.

In einem zweiten Vorversuch wurde Äther pro narcosi als Extraktionsmittel verwendet. Der Äther, der hier die obere Schicht bildet, konnte leicht abgehebert werden.

Außerdem ergab sich bei einer dreimaligen Wiederholung dieses Extraktionsganges eine Wiederfindung von zugesetztem, radioaktivem Östrogen um 70 %. Aus diesen Gründen wurde die Ätherextraktion für die weiteren Versuche verwendet. Nach diesen Vorversuchen konnte ein endgültiger Arbeitsgang aufgestellt werden.

3.1.3.3.2. Endgültiger Aufarbeitungsgang

3.1.3.3.2.1. Homogenisation und interne Standardisierung

Frei präpariertes Muskelgewebe wurde mit einem Fleischwolf vorzerkleinert und gut vermengt, um ein möglichst homogenes Ausgangsmaterial zu erhalten.

1,0 g dieser vorzerkleinerten Fleischmenge wurde in ein 30 ml Zentrifugenglas mit Schliff eingewogen. Danach wurden 5,0 ml Aqua bidest. als Homogenisationsmedium zugegeben.

Für die nun folgende Homogenisierung, die direkt im Zentrifugenglas stattfand, wurde ein Ultra-Turrax verwendet. Während des Homogenisierens wurde die Probe durch Eis gekühlt. Die erste Zerkleinerungsperiode dauerte 90 Sekunden. Nun erfolgte zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste die Zugabe des internen Standards (s. Kapitel 3.3.3.2.5.). Es folgte eine weitere Zerkleinerungsperiode von nochmals 90 Sekunden Dauer. Anschließend wurde der Schaft des Ultra-Turrax zuerst mit 5,0 ml Aqua bidest. und anschließend mit 2,0 ml Äther in das Zentrifugenglas abgespült.

3.1.3.3.2.2. Ätherextraktion

Nach Zugabe von 15,0 ml Äther wurde die Probe 2 Minuten lang nicht allzu heftig mit der Hand geschüttelt. Danach wurde auf Eis gekühlt und anschließend 5 Minuten bei ca. 2000 UpM abzentrifugiert. Der Überstehende Ätherextrakt wurde mit einer Einweg-Pasteurpipette in ein konisches 15,0 ml Zentrifugenglas abgehebert und im Stickstoffstrom bei 40°C niedergetrocknet. Der ganze Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei die Ätherextrakte vereinigt wurden.

3.1.3.3.2.3. Gewinnung der phenolischen Fraktion

Nach Einengung der Probe im Stickstoffstrom, wobei die Glaswand mit einigen Tropfen Methanol abgespült wurde, folgt eine Lösungsverteilung zwischen 1,0 ml Aqua bidest. und 2,0 ml Äther. Hierbei wurde die Probe 30 Sekunden an einem Vortexmixer gemischt und anschließend zur optimalen Trennung der beiden Phasen kurz abzentrifugiert. Die Ätherfraktion wurde in ein weiteres konisches Glas transferiert (verwendet wurden dazu Einweg-Pasteurpipetten); die wässrige Phase wurde noch zweimal mit 2,0 ml Äther rückextrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden anschließend unter Stickstoff

niedergetrocknet, der Rückstand wurde in 1,0 ml des Gemisches Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform (5:1) aufgenommen und dreimal mit 0,5 ml 1N Natronlauge extrahiert (die Probe wurde hierzu wieder 30 Sekunden am Vortexmixer durchgemischt und dann kurz abzentrifugiert). Die in einem konischen Zentrifugenklas gesammelten NaOH-Extrakte enthielten die phenolische Fraktion, also die Östrogene. Die Trennung beruhte darauf, daß die Östrogene aufgrund ihres phenolischen A-Ringes im stark alkalischen Milieu wasserlösliche Salze bilden und in dieser Form von anderen mitextrahierten, nicht-phenolischen Steroiden durch Verteilung zwischen einem organischen Lösungsmittel und der wäßrigen alkalischen Phase abgetrennt werden können. Nach Einstellung des pH-Wertes der alkalischen Fraktion auf 7 - 8 mit 1N Salzsäure (Überprüfung mit Indikatorpapier), wonach die Östrogene wieder in ihrer ursprünglichen freien Form vorliegen, wurden diese nun dreimal mit 2,0 ml Chloroform extrahiert. Das Volumen der in einem Einweg-Testglas vereinigten Chloroform-Extrakte wurde im Stickstoffstrom auf ca. 3,0 ml eingeengt. Anschließend wurde die Probe zunächst mit 1,0 ml Phosphatpuffer und dann zweimal mit 2,0 ml Aqua bidest. gewaschen. Die Probe wurde nun nochmals unter Stickstoff niedergetrocknet, wobei die Glaswand mit einigen Tropfen Methanol nachgespült wurde, um den Extrakt am Boden des Glases zu konzentrieren.

Nach Abschluß dieses Extraktionsschrittes wäre es theoretisch möglich gewesen, wie bei Plasma und Urin, die Gesamtöstrogene zu bestimmen. Es zeigte sich jedoch, daß der Extrakt zu diesem Zeitpunkt noch nicht rein genug und eine sinnvolle Messung noch nicht möglich war. Als weitere Reinigung wurde ein säulenchromatographischer Schritt eingeführt.

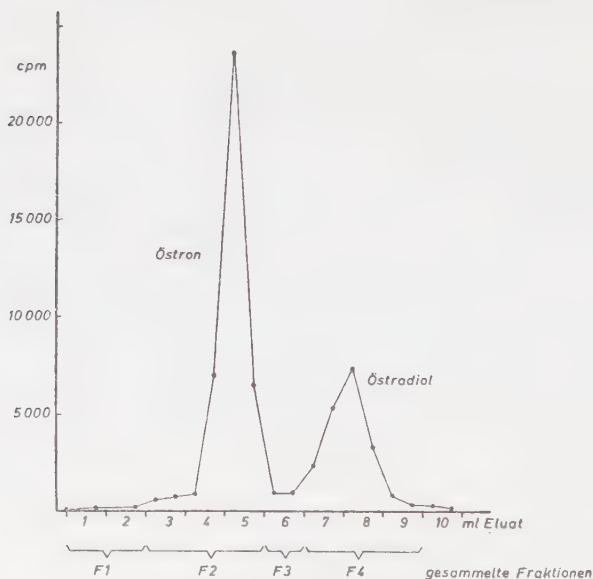
Da es bei diesem Aufarbeitungs-gang zu einer gleichzeitigen Trennung von Östron und Östradiol kommt, war es somit möglich und sinnvoll, beide Hormone getrennt zu erfassen.

3.1.3.3.2.4. Säulenchromatographie

Als Trägersubstanz wurde Sephadex LH 20 verwendet. Die Sephadexsäule hatte eine Länge von 90 mm und einen Durchmesser von 8 mm. Als Laufmittel wurde Benzol/Methanol (85 : 15) verwendet (MIKAIL et al. 1970). Der Extrakt wurde in 100 µl Laufmittel aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Eindringen des Auftragsvolumens wurden 2,0 ml Laufmittel aufgetragen, die Passage durch die Säule abgewartet und als Fraktion F1 gesammelt. Entsprechend wurden 3,0 ; 1,0- und 4,0 ml Laufmittel nacheinander aufgetragen und als die Fraktionen F2, F3 und F4 gesammelt. F2 enthielt das Östron und F4 enthielt das Östradiol. In Abb. Nr. 14 ist eine solche Trennung graphisch dargestellt.

Abb. 14

Trennung von Östron und Östradiol auf Sephadex LH 20
Säulen



Alle Fraktionen wurden unter Stickstoff niedertrocknet und in einem bestimmten Volumen Methanol (2,0 bis 6,0 ml) aufgenommen.

Ein aliquoter Teil hiervon wurde zur Erfassung der Radioaktivität, d.h. zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste entnommen.

Die Impulse in den einzelnen Fraktionen dienten auch zur Beurteilung des Trenneffektes bei jeder einzelnen Probe. Weitere aliquote Teile wurden für den RIT entnommen.

Die Chromatographiesäulen selbst wurden nach durchgeführter Trennung mit dem oben angegebenen Laufmittel gespült (ca. 100 ml pro Säule) und konnten dann wieder verwendet werden.

3.1.3.3.2.5. Berechnung der Wiederfindung

Die "Wiederfindung" ist ein Korrekturfaktor, mit dessen Hilfe die Aufarbeitungsverluste erfaßt werden können. Hierzu wird eine bekannte, geringe, den RIT nicht beeinflussende Menge an markiertem Hormon als interner Standard der biologischen Probe von Anfang an zugesetzt; bei unseren Untersuchungen ^3H -Östron und ^3H -Östradiol-17 β . Es kann nun vorausgesetzt werden, daß sich das endogene und das zugegebene radioaktive Hormon während des Aufarbeitungsganges identisch verhalten. Am Ende dieses Aufarbeitungsganges wird der biologische Extrakt in einem bestimmten Volumen (GV) Lösungsmittel aufgenommen. Für unsere Zwecke wurde als Lösungsmittel Methanol herangezogen, wovon dann ein aliquoter Teil (AT) zur Erfassung der Radioaktivität entnommen wurde. Für die Berechnung der Wiederfindung (WAF) für die noch in der Restprobe vorhandene Hormonmenge wurde dann folgende Formel verwendet:

$$WAF = \frac{cpm \cdot (GV - AT) \cdot 100}{CPM \cdot AT} \quad (\%)$$

cpm = Impulse pro Minute, gezählt im aliquoten Teil (AT)

CPM = Impulse pro Minute des anfangs als internen Standard zugegebenen radioaktiven Hormons

GV = Gesamtvolumen Endextrakt

AT = aus GV entnommener aliquoter Teil

Die Erfassung von CPM und cpm (s.o.) geschah stets am gleichen Gerät unter identischen Zählbedingungen, wobei der Gerätenullwert berücksichtigt wurde, so daß eine Umrechnung in dpm (tatsächliche Zerfallsrate) nicht notwendig war. Mit Hilfe dieses Wiederfindungsfaktors konnte der im RIT ermittelte Östrogenwert auf die ursprünglich in der Probe vorhandene Östrogenmenge zurückgerechnet werden. Eine solche Errechnung der Wiederfindung mit Hilfe eines internen Standards erwies sich bei der Untersuchung von Muskelgewebe als unbedingt notwendig; die Wiederfindung lag hier durchschnittlich bei 40 %, zeigte jedoch Schwankungen, die gelegentlich 20 % darüber oder darunter liegen konnten. Als interner Standard, der - wie im Kapitel 3.3.3.2.1. beschrieben - während des Homogenisierens zugesetzt wurde, wurden 2,5 pg ^3H -Östron $\hat{=}$ 2000 dpm und 2,9 pg ^3H -Östradiol-17B $\hat{=}$ 2000 dpm eingesetzt.

Die individuelle Berechnung der Wiederfindung erwies sich bei Plasma, Urin und Follikelflüssigkeit als nicht notwendig, da Vorversuche ergaben, daß die durchschnittliche Wiederfindung konstant bei ca. 77,6 % lag.

3.1.4. Beurteilung der angewandten Bestimmungsverfahren

3.1.4.1. Zuverlässigkeitskriterien

Für die Beurteilung der Methoden wurden die Zuverlässigkeitskriterien Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit herangezogen.

Allgemein ist bei radioimmunologischen Verfahren die Spezifität weitgehend von den verwendeten Antisera abhängig.

Bei der Messung von Gesamtöstrogenen in Plasma, Follikelflüssigkeit und Urin hat die Spezifitätscharakteristik des verwendeten Antiserums SE2-E2-AK14 gezeigt (siehe Abb. Nr. 9 in Kapitel 3.2.2.1.), daß dieses ausschließlich mit Östrogenen und nicht mit den anderen überprüften Steroiden reagiert hat. Trotz dieser Spezifität und der Durchführung eines Extraktionsschrittes kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Antiserum dennoch mit noch vorhandenen Fremdsubstanzen oder anderen als den bei der Spezifitätsprüfung getesteten Östrogenen reagiert hat. Aus diesem Grund kann das Ergebnis also nicht mit letzter Sicherheit objektiviert werden; für die kritische Diskussion hat sich allgemein eingebürgert, von "radioimmunologisch aktiven Östrogenen", das entspricht in unserem Fall den Gesamtöstrogenen, zu sprechen.

Als sehr viel spezifischer sind die Ergebnisse bei der Messung von Östron und Östradiol-17B im Muskelgewebe anzusehen. Dies ergibt sich zunächst aus den verwendeten Antisera, die eine hohe Spezifität zu dem jeweiligen Östrogen aufwiesen (siehe dazu Abb. Nr. 10 und Abb. Nr. 12 aus den Kapiteln 3.2.2.2. und 3.2.2.3.). Zudem trug ein umfangreicher Aufarbeitungsgang, bei dem insbesondere die Punkte "Gewinnung der phenolischen Fraktion" und "säulenchromatographische Trennung" ins Gewicht fielen, zu einer starken Erhöhung der Spezifität bei. Als eine weitere Ergänzung dieser Spezifitätsangaben ist der im Kapitel 3.5. angegebene Methodenvergleich anzusehen.

Die Empfindlichkeit der Methode war einmal gegeben durch die kleinste Menge, die sich, bei Vorversuchen mit Standardsubstanzen, noch von Null unterscheiden ließ. Im Rahmen vorliegender Untersuchungen lag dieser Wert bei ca. 10 pg.

Dem Übergeordnet ist jedoch der Wert, der sich als Reagentienleerwert aus den verwendeten Materialien und Reagentien ergibt. Bei der Aufarbeitung von Plasma- und Urinproben, bei der lediglich eine Ätherextraktion durchgeführt wurde, ergab sich ein durchschnittlicher Reagentienleerwert von 0,01 ng. Bei Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 2 ergab sich eine untere Meßgrenze von 0,02 ng.

Bei der Untersuchung von Muskelgewebeproben ergab sich der Leerwert aus Blindversuchen, bei denen praktisch der ganze Extraktionsgang ohne Gewebezusatz durchgeführt wurde.

Für Östron (Antiserum Nr. AS 436 KUSS) ergab sich in 19 Bestimmungen ein durchschnittlicher Leerwert von 0,03 ($\pm$ 0,02) ng; somit konnte hier, entsprechend dem oben angegebenen Sicherheitsfaktor von 2, die untere Meßgrenze bei 0,06 ng festgelegt werden.

Für Östradiol-17B (Antiserum Nr. SE1-E2-AK16) lag in 16 Bestimmungen der Leerwert bei durchschnittlich 0,02 ($\pm$ 0,02) ng; bei Berücksichtigung des Sicherheitsfaktors von 2 konnte hier die untere Meßgrenze auf 0,04 ng festgelegt werden.

Die Genauigkeit der Methode bei der Bestimmung von Östrogenen in Plasma und Urin wurde durch die Wiederfindung von nicht markiertem Östradiol-17B, das einem ml Aqua bidest. vor der Extraktion zugesetzt wurde, überprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen, die von anderer Seite im hiesigen Labor durchgeführt wurden, ist in Tabelle Nr. 2 dargestellt (Tabelle siehe HOFFMANN 1972, S. 58.).

Tabelle 2

Wiederfindung von Östradiol-17 β , einem ml Aqua bidest.
oder Plasma zugesetzt

Extraktion von 1 ml	Zusatz Östradiol-17 β ng	Wiederfindung ng	S	VK %	n
Aqua bidest.	0,020	0,020	0,007	37,6	3
	0,050	0,049	0,003	6,5	3
	0,100	0,102	0,014	13,7	6
	0,250	0,233	0,020	8,5	6
	0,500	0,474	0,023	4,8	6
Bullen Plasma	0,500	0,512	0,037	7,2	10
	1,000	1,026	0,076	7,4	11

Das Ergebnis der Wiederfindung von Östradiol-17 β ist zufriedenstellend.

In entsprechender Weise wurde die Wiederfindung für Östron und Östradiol-17 β bei dem Aufarbeitungsgang für Muskelgewebe stichprobenartig überprüft.

Für Östron ergab sich bei Zusatz von 1 ng eine Wiederfindung von 0,96 ($\pm$ 0,40) ng und bei einem Zusatz von 2 ng eine Wiederfindung von 2,23 ($\pm$ 0,22) ng; es wurden jeweils 4 Doppelbestimmungen durchgeführt.

Für Östradiol-17 β ergab sich bei Zusatz von 1 ng eine Wiederfindung von 1,44 und 1,03 ng und bei Zusatz von 2 ng Östradiol-17 β eine Wiederfindung von 1,60 und 1,92 ng; hier wurden jeweils 2 Doppelbestimmungen durchgeführt.

Obwohl hier die Werte noch gewisse Schwankungen zeigen, die sich mit Sicherheit bei einer größeren Routine hätten verbessern lassen, kann auch für die Extraktion von Muskelgewebe das Ergebnis der Wiederfindung als zufriedenstellend bezeichnet werden.

Bei der Überprüfung der Genauigkeit wurde auch besonders darauf geachtet, inwieweit durch die Säulenchromatographie dieses Zuverlässigkeitskriterium beeinflusst wurde.

In erster Linie ist hier die Trennfähigkeit zu nennen. Sie wurde in jeder einzelnen Probe anhand des zugesetzten internen Standards überprüft (siehe Kapitel 3.3.3.2.5.), indem in allen gesammelten Fraktionen (F1 - F4) die Impulsmengen erfaßt wurden (siehe Kapitel 3.3.3.2.4.). Allgemein ergab sich eine gute Trennung, wobei die Wiederfindung von zugesetztem ^3H -Östron durchschnittlich bei 43,9 ($\pm 8,8$) %, die von zugesetztem ^3H -Östradiol-17 β durchschnittlich bei 45,5 ($\pm 9,6$)% lag; (es wurden jeweils 16 Doppelbestimmungen durchgeführt).

Gelegentlich kam es nach längerem Gebrauch vor, daß die Trennschärfe einer Chromatographiesäule nachließ; diese Säule wurde dann verworfen und eine neue angesetzt.

Die Überprüfung der Genauigkeit der Säulenchromatographie wurde auch mit nichtmarkiertem Östron und Östradiol-17 β durchgeführt. Als ein Gemisch wurden je 0,2 ng oder je 0,6 ng Östron und Östradiol-17 β aufgetragen. Tabelle Nr. 3 zeigt das Ergebnis der Wiederfindung.

Tabelle 3

Wiederfindung von nicht markiertem Östron und Östradiol-17 β
bei Überprüfung der Genauigkeit der Säulenchromatographie

aufgetragenes Östrogen	Zusatz	$\bar{X}$	Wiederfindung		
			S	VK %	n
Östron	0,2	0,24	0,09	18,00	6
	0,6	0,59	0,14	23,00	6
Östradiol-17 β	0,2	0,22	0,11	22,00	6
	0,6	0,58	0,10	17,00	6

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Säulenchromatographie, die ja einen speziellen Aufarbeitungsschritt darstellt, den an die Zuverlässigkeit gestellten Ansprüchen gerecht wird.

Für die Kontrolle der Reproduzierbarkeit bei der Untersuchung von Plasmaprobe(n) seien die parallel im Labor durchgeführten Mehrfachbestimmungen der Gesamtöstrogene in drei Plasmapools in Tabelle Nr. 4 aufgeführt (Tabelle siehe HOFFMANN 1972/Seite 59).

Tabelle 4

Mehrfachbestimmungen der Gesamtöstrogene in
drei Plasmapools

Plasmapool	Mittelwert Gesamtöstrogene	S ($\pm$)	VK %	n
1	0,192	0,030	15,65	18
2	0,212	0,031	14,84	6
3	0,307	0,026	8,45	4

Das Resultat kann als zufriedenstellend bezeichnet werden. Der Wert für die Reproduzierbarkeit der Östron- und der Östradiol-17 β -Bestimmung im Muskelgewebe ergab sich aus Mehrfachbestimmungen in Geweben eines unbehandelten und eines östrogenbehandelten Kalbes.

Bei 16 Bestimmungen ergab sich beim nichtbehandelten Kalb ein Wert für Östron von 0,41 ($\pm$ 0,20) ng/g Muskelgewebe und für Östradiol-17 β bei 16 Bestimmungen ein Wert von 0,61 ($\pm$ 0,25) ng/g Muskelgewebe. Die entsprechenden Werte beim östrogenbehandelten Kalb lagen für Östron in 16 Bestimmungen bei 0,19 ($\pm$ 0,06) ng/g Muskelgewebe und für Östradiol-17 β bei 16 Bestimmungen bei 5,50 ($\pm$ 1,26) ng/g Muskelgewebe (siehe Kapitel 4.1.5.).

Das Ergebnis der Reproduzierbarkeit kann auch für Muskelgewebe als annehmbar bezeichnet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die an die Methode gestellten Ansprüche hinsichtlich der Zuverlässigkeit im Wesentlichen erfüllt werden. Gewisse weitere Verbesserungen werden und können sich erst bei Anwendung im Routinetest ergeben.

3.1.4.2. Methodenvergleich mit einem fluorimetrischen Verfahren

Hierzu wurden Urin- und Muskelgewebeproben sowohl radioimmunologisch als auch fluorimetrisch untersucht.

Die fluorimetrische Östrogenbestimmung im Urin wurde von VOGT et al. (1972) nach einer modifizierten Ittrich-Methode (ITTRICH 1960) durchgeführt.

Die Anwendung der zwei Bestimmungsmethoden bei der Untersuchung von Urin, die auf zwei grundsätzlich verschiedenen Meßprinzipien beruhen, führte zu Ergebnissen, die bezüglich des Verlaufs der Östrogenausscheidung eine recht gute Übereinstimmung zeigten (siehe Kapitel 4.1.3.), obwohl die fluorimetrisch ermittelten Östrogenwerte meist niedriger lagen. Für diese Übereinstimmung ergab sich beim behandelten Kalb, das aufgrund der ermittelten höheren Absolutwerte herangezogen wurde, ein mit $p < 0,01$ statistisch gesicherter Korrelationskoeffizient von $r = 0,53$. Die meist etwas niedriger liegenden Werte bei der fluorimetrischen Methode können dahingehend interpretiert werden, daß 1. bei dem aufwendigeren Arbeitsgang bis zur fluorimetrischen Messung höhere Aufarbeitungsverluste auftreten und daß 2. der Ansatz des zur Fluoreszenzmessung verwendeten Reagenzes auf Östradiol-17 β ausgerichtet war; das notwendige H_2SO_4 -Reagens enthielt 64 % Schwefelsäureanteile. Mit dem RIT dagegen wurden die Gesamtöstrogene gemessen. Auch für Muskelgewebe wurde eine solche Paralleluntersuchung durchgeführt.

Hierfür wurden 10 x 2 g Muskelfleisch nach dem beschriebenen Aufarbeitungsgang extrahiert und aufgearbeitet; die gesammelten Östradiolfractionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer evaporiert und anschließend nochmals der Säulenpassage unterzogen. Die so gewonnene Probe wurde nach der Vorschrift von EECHAUTE (1969) fluorimetrisch gemessen.

Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im ng-Bereich. Für die Messung selbst ergibt sich in gekürzter Form folgender Reaktionsansatz: in die nach der Säulenpassage niedergetrocknete Probe wurden zuerst 20 mg Hydrochinon eingewogen, danach wurden 0,4 ml Aqua bidest. zugegeben; nach Schütteln bis zur Auflösung des Hydrochinons und einer Abkühlung auf 0°C im Eisbad wurden dann 0,75 ml konzentrierte Schwefelsäure dazupipettiert.

Nun wurde die Probe 40 Minuten im Wasserbad gekocht; nach erneuter Zugabe von Aqua bidest. und weiterem Aufenthalt im Eisbad erfolgte die Zugabe des zweiten Reagenzes. Dieses bestand aus 200 mg 4-Nitrophenol gelöst in 10 ml Chloroform. Nach erneutem kräftigen Schütteln wurde bei 3000 UpM abzentrifugiert.

Nach kurzer Kühlung im Eisbad wurde das Chloroform, in dem sich der gebildete fluoreszierende Farbstoff befand, abgehebert und fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 546 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm gemessen. Das fluorimetrisch erhaltene Ergebnis von 4,8 ng Östradiol-17 β pro g Muskelgewebe stimmte gut mit dem im RIT ermittelten Durchschnittsergebnis von 5,5 ng Östradiol-17 β pro g Muskelgewebe überein (siehe auch Kapitel 4.1.5.).

3.1.5. Erfassung der Radioaktivität

Als radioaktives Isotop gelangte ausschließlich Tritium (^3H) zur Messung; für die Messung standen zwei Flüssigkeitsscintillationszähler zur Verfügung.

Bei beiden Geräten war ein Kanal auf eine optimale Tritiumsausbeute eingestellt, die konstant bei 40 % bzw. 56 % lag.

Die Scintillationsflüssigkeit (Bray's Solution), bezogen auf 1 Liter Volumen, setzte sich wie bei NEILL et al. (1967) angegeben, aus 7 g PPO (2,5-Diphenyloxazol), 0.3 g POPOP (1,4-bis-2-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl-Benzol) und 100 g Naphtalin (reinst), gelöst in 1 Liter Dioxan, zusammen. 10 ml hiervon genügten für eine Messung. Als Zählküvetten wurden Niederdruck-Polyäthylen-Einwegzählfläschchen der Firma Zinsser, Frankfurt, verwendet.

Da eine zusammengehörende Probenserie immer an einem Gerät gezählt wurde, konnte auf eine Umrechnung auf die tatsächlich vorhandenen Zerfälle "dpm" (disintegrations per minute) durch Berücksichtigung der oben angegebenen Faktoren "Zählausbeute" verzichtet werden. Alle Berechnungen wurden daher nur mit den tatsächlich erfassten Impulsen "cpm" (counts per minute) durchgeführt.

Für die Auswertung von Radiochromatogrammen stand ein Dünnschicht-scanner der Fa. Berthold zur Verfügung.

3.1.6. Verwendete Reagentien und Materialien

Lösungsmittel:

Äther pro narcosi (Fa. Hoechst); die Flaschen wurden frisch geöffnet und nur einen Tag verwendet.

Tetrachlorkohlenstoff p.a. (Riedel de Haën, Nr. 32215) wurde, wie vom Hersteller geliefert, eingesetzt. Alle übrigen Lösungsmittel (Methanol, Chloroform, Benzol) wurden in p.a.-Qualität bezogen und vor Gebrauch destilliert.

Zur Darstellung von Aqua bidest wurde entsalztes Wasser über Quarzsand destilliert.

Säuren und Laugen:

Beide, 1N Natronlauge (Merck Nr. 9137) und 1N Salzsäure (Merck Nr. 9057), waren auf den Faktor 1,00 eingestellt.

10 %-ige Orthophosphorsäure wurde durch Verdünnung von 85 %-iger Orthophosphorsäure p.a. (Riedel de Haën Nr. 30417) mit Aqua bidest. angesetzt.

Puffer:

Phosphatpuffer (pH 7,2/0,1 M) setzte sich zusammen aus:

2,686 g Kaliumdihydrogenphosphat, 8,356 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,325 g Natriumazid in 1 Liter Aqua bidest.

Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin: Zu 1 Liter oben angeführten Phosphatpuffers wurden 1 g Rinderserumalbumin gegeben und zur Lösung gebracht.

Für die Darstellung von 2 M Acetatpuffer (pH 4,8) wurden 16,4 g Natriumacetat p.a. (Merck Nr. 6268) und 9 g Essigsäure (Eisessig) p.a. (Merck Nr. 60) in 1 Liter Aqua bidest. zur Lösung gebracht.

Adsorbentien:

Als Material für die Säulenchromatographie wurde Sephadex LH 20 (Pharmacia Fine Chemicals) verwendet. Die im RIT verwendete Kohlen suspension setzte sich zusammen aus 5 g Holzkohle (Norit A, Partikelgröße 4 - 5 μ) und 500 mg Dextran, pharm. (Fa. Serva, M = 60000 - 90000) in 1 Liter Aqua bidest.

Enzyme:

Die für die Hydrolyse der Urinproben verwendeten Enzyme β -Glucuronidase und Sulfatase lagen vor in Form von Schneckensaft (Suc d'Helix pomatia, Industrie Biologique Francaise). 1 ml enthielt 100 000 U β -Glucuronidase und 800 000 U Sulfatase.

Verwendete Steroids Substanzen:

Die nicht radioaktiv markierten Östrogene wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; System; Benzol:Methanol = 9 : 1), sowie durch Mikroschmelzpunktbestimmung auf Reinheit und Identität überprüft.

Die mit Tritium markierten Östrogene, Östron (Östron-2,4,6,7- $^3\text{H}(n)$, 100 Ci/mmol) und Östradiol-17 β (Östradiol-17 β -2,4,6,7 $^3\text{H}(n)$, 85 Ci/mmol), beide bezogen von der Fa. Radiochemical Centre Amersham, England, wurden in Mischchromatogrammen mit den entsprechenden nichtmarkierten Östrogenen auf Identität und radiochemische Reinheit in dem oben angegebenen Laufmittelsystem überprüft.

Besondere Glaswaren und Geräte:

Einweggläser für den RIT (AR-Glas 74 x 14 mm) wurden von der Fa. Kremer und Kreiler, München, bezogen.

Der verwendete Homogenisator, ein Ultra-Turrax (TP 18/2N) stammte von der Fa. Janke und Kunkel.

Die Zugabe des Antiserums im RIT erfolgte mit einer Revolverspritze, Modell "Muto" von der Fa. Hauptner, München; für die Zugabe der Kohlensuspension stand eine automatische Selbstfüllerspritze, Modell "Ultra Asept", Fa. Henke, mit einem Füllvolumen von 2 ml zur Verfügung.

3.2. Bestimmung von Kreatinin

Als Bezugsgröße für Östrogene im Urin wird heute vielfach Kreatinin herangezogen (siehe auch Diskussion, Kapitel 5.2.1.).

Für die Kreatininbestimmung wurde die von SZADKOWSKI et al. (1970) angegebene Methode verwendet. Dabei wurden 0,1 ml Urin mit 2,0 ml 1,2 %-iger Pikrinsäurelösung und mit 0,15 ml 10 %-iger Natronlauge

versetzt und nach 10 Minuten mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten wurde in 1 cm-Küvetten bei 590 nm gegen einen Leerwert (0,1 ml destilliertes Wasser in gleicher Weise wie Urin verarbeitet) photometriert; die Werte wurden anhand einer Standardkurve errechnet.

3.3. Statistik

Für die Errechnung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der t-Werte stand ein OLIVETTI Tischcomputer "programma 101" mit zugehörigem Programm zur Verfügung.

Für die Auswertung der t-Tests wurden SNEDECOR's Tabellen verwendet (SNEDECOR 1956).

4. Tierversuche und Ergebnisse

4.1. Ergebnisse bei Anwendung der beschriebenen Verfahren im Rahmen eines Modellversuchs bei zwei weiblichen Mastkälbern

4.1.1. Durchführung des Tierversuchs

4.1.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung

Zwei weibliche Höhenfleckviehkälber, vermutlich Zwillingskälber, die nach eigenen Beobachtungen klinisch gesund waren, wurden im Alter von vier Wochen eingestellt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten, um eine einwandfreie Probenentnahme zu gewährleisten. Die Raumtemperatur lag konstant bei 18°C.

Während der Versuchszeit erhielten die Tiere einen Vollmilchautauscher (Raiffeisen-Kraftfutterwerke GmbH, München, Werk Würzburg) als Alleinfutter, der nach Angaben des Herstellers folgendermaßen zusammengesetzt war:

55,00 % Magermilchpulver, 12,50 % Süßmolkenpulver,
12,10 % verzuckerte Maisstärke, 12,00 % Fettmischung
(Kokosöl, Sojaöl, Schweinefett, Rinderfett), 4,05 % Sojafeinmehl,
2,50 % Maiskleber, 1,00 % Mineralstoffmischung für Kälber,
0,60 % Vitaminvormischung für Kälber und 0,25 % antibiotische
Vormischung, Reg. Nr. Fm 4587/68, (100 mg CTC/kg Mischfutter).

4.1.1.2. Behandlung der Tiere und Probengewinnung

An eine Anpassungsphase von zwölf Tagen, während der nur stichprobenartig Urin- und Blutproben gewonnen wurden, schloß sich der Versuch an, der 36 Tage dauerte.

Dem Versuchskalb wurde am zwölften Tage nach der Aufstallung ein Präparat in Form von sieben Preßlingen, die als Gesamtdosis 25 mg

Östradiolbenzoat (1,3,5, (10)-Östratrien-3-17 β -diol-3-benzoat) und 140 mg Trenbolonacetat (17 β -Acetoxy[4,9,11]-3-on-Östratrien) erhielten, subcutan in den Triel verabreicht.

Nach dieser Behandlung wurden von beiden Kälbern jeden 2. Tag Blutproben (ca. 30 ml) durch Punktion der Vena jugularis entnommen; dies geschah etwa immer zur gleichen Uhrzeit (ca. 15.30 Uhr). Das gewonnene Blut, dem ca. 100 μ l des Heparinpräparates Liquemin[®] (HOFFMANN-LA ROCHE, Basel) als Gerinnungshemmer zugesetzt waren, wurde 10 Minuten bei 4000 UpM und 4°C zentrifugiert.

Das abpipettierte Blutplasma wurde dann bei -18°C tiefgefroren aufbewahrt.

Nach der Morgenfütterung (ca. 8.00 Uhr) wurde spontan abgesetzter Urin am Körper der Tiere aufgefangen. Dies geschah beim Versuchskalb täglich, beim Kontrollkalb beschränkte sich die Probennahme auf 3 Tage pro Woche. Die Urinproben wurden ebenfalls tiefgefroren bei -18°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

36 Tage nach Behandlungsbeginn wurden die Tiere geschlachtet, dabei wurden Muskelgewebe und Blut entnommen, weiterhin für etwaige spätere Untersuchungen Niere, Leber und Fettgewebe; die entnommenen Gewebe und das durch Zentrifugieren gewonnene Blutplasma wurden ebenfalls bei -18°C aufbewahrt.

Bei der Schlachtung zeigte sich auch, daß die Ovarien sowohl vom Kontroll- als auch vom Versuchskalb mehrere linsen- bis erbsengroße Follikel aufwiesen. Von jedem Kalb wurde die Follikelflüssigkeit durch Punktion gewonnen, gepoolt und ebenfalls bei -18°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

Weiterhin zeigte sich, daß das Implantationsmaterial zu etwa 50 % resorbiert war.

4.1.2. Vergleich des Lebendgewichtes beider Kälber zu Versuchsbeginn und Versuchsende

Hier kann als sichtbares Ergebnis das deutlich höhere Lebendgewicht des behandelten Kalbes bei Versuchsende festgehalten werden. In Tabelle Nr. 5 sind die Gewichte beider Kälber bei der Einstellung und am Schlachttag aufgeführt.

Tabelle 5

Lebendgewichtvergleich vom Kontroll- und Versuchskalb am Tag der Einstellung und am Schlachttag

	Kontrollkalb	Versuchskalb
Gewicht bei der Einstellung (kg)	69	71
Gewicht bei Versuchsende (kg)	130	141
Gewichtszunahme (kg)	61	70

Die Gewichts Differenz zwischen Kontroll- und Versuchskalb betrug zu Versuchsbeginn 2 kg, das sind 2,9 % Unterschied, bezogen auf das Körpergewicht des Versuchskalbes; bei Versuchsende lag die Gewichts Differenz bei 11 kg, das sind 7,8 %, wiederum bezogen auf das Körpergewicht des Versuchskalbes.

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, ergibt sich für das Kontrollkalb im Versuchszeitraum eine Gewichtszunahme um 61 kg; das Versuchskalb dagegen nahm um 70 kg zu.

Man kann also sagen, daß das Versuchskalb absolut um 9 kg mehr zugenommen hat, bei gleichem Futterverzehr wie das Kontrollkalb (den Tieren wurde täglich die gleiche Futtermenge angeboten, die restlos verzehrt wurde).

4.1.3. Ergebnisse der Östrogenbestimmung im Plasma

Wie schon in Kapitel 3.3.1. geschildert, wurden im Plasma die Gesamtöstrogene bestimmt. Die Untersuchungen erstreckten sich vom Tag der Aufstallung der beiden Kälber bis einschließlich zum Schlachttag.

Die Ergebnisse der Gesamtöstrogenbestimmungen sind in Tabelle Nr. 6 dargestellt.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Werte beim Kontrollkalb während des gesamten Untersuchungszeitraumes relativ konstant zwischen 0,052 und 0,165 ng/ml Plasma schwankten. Beim Versuchskalb ergaben sich etwas stärker schwankende Östrogenwerte, die aber auch während der gesamten Versuchsdauer in der gleichen Größenordnung lagen; von einer Ausscheidungskurve kann nicht gesprochen werden. Die Östrogenkonzentrationen liegen hier allgemein etwas höher als beim Kontrollkalb, zwischen 0,103 und 0,332 ng/ml Plasma. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist zur Verdeutlichung nochmals in Abb. Nr. 15 dargestellt.

Bei Berücksichtigung der Meßwerte ab dem Tag der Behandlung wurde für das Kontrollkalb ein Mittelwert von 0,121 ($\pm$ 0,022) und für das Versuchskalb ein Mittelwert von 0,218 ($\pm$ 0,064) ng Gesamtöstrogene/ml Plasma errechnet.

Bei Anwendung des t-Testes ($t = 6,9148$, bei 32 Freiheitsgraden) ergibt sich mit $p < 0,001$ ein gesicherter Unterschied zwischen den beim behandelten und unbehandelten Kalb gemessenen Werten.

Allerdings fanden sich bereits vor der Behandlung entsprechende Unterschiede bei beiden Kälbern. Die Mittelwerte lagen hier für das behandelte Kalb bei 0,174 und für das Kontrollkalb bei 0,119 ng/ml Plasma.

Die Mittelwerte für den gesamten Untersuchungszeitraum lagen bei 0,121 ($\pm$ 0,022) bzw. 0,205 ($\pm$ 0,067) ng/ml Plasma beim Kontroll- bzw. Versuchskalb.

Tabelle 6

Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtöstrogene
im Plasma beim Kontroll- und Versuchskalb

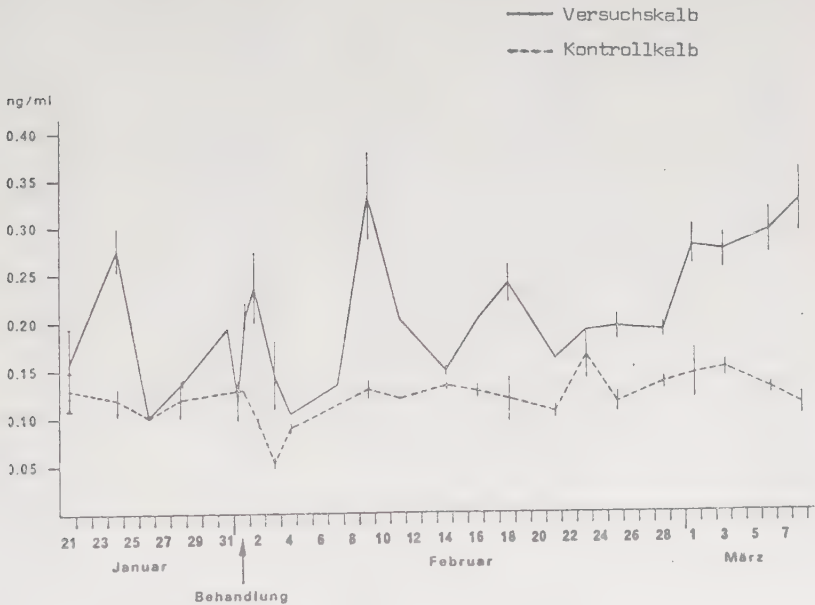
Blutprobenentnahme		Gesamtöstrogene (ng/ml)	
Datum	Uhrzeit	Kontrollkalb	Versuchskalb
21.1.72	ca.15.30	0,129	0,158
24.1.	"	0,121	0,277
26.1.	"	0,104	0,103
28.1.	"	0,121	0,138
31.1.	"	+	0,194
1.2.	9.00 (Behandlung)	+	0,119
1.2.	15.45	0,129	0,206
2.2.	ca.15.30	0,095	0,235
3.2.	"	0,062	0,145
4.2.	"	0,089	0,103
7.2.	"	++	++
9.2.	"	0,129	0,275
11.2.	"	0,121	0,332
14.2.	"	0,137	0,203
16.2.	"	0,128	0,149
18.2.	"	0,119	0,201
21.2.	"	0,106	0,240
23.2.	"	0,165	0,161
25.2.	"	0,115	0,179
28.2.	"	0,136	0,194
1.3.	"	0,146	0,191
3.3.	"	0,151	0,280
6.3.	"	0,129	0,296
8.3.	10.00 (Schlachtung)	0,113	0,327
Mittelwert (gesamte Versuchszeit)		0,121	0,205
(+ s)		0,022	0,067

+ Keine Blutentnahme

++ Probe abhanden gekommen

Abb. 15

Gesamtöstrogenkonzentration im Plasma von Kontroll- und Versuchskalb während der gesamten Versuchsdauer



4.1.4. Ergebnisse der Östrogenbestimmung im Urin

Die mit Hilfe des RIT erhaltenen Gesamtöstrogenwerte sind in der Tabelle Nr. 7 für das Kontrollkalb und in Tabelle Nr. 8 für das behandelte Kalb zusammengefaßt.

Tabelle 7
Östrogenausscheidung und Kreatininkonzentrationen im Urin beim
Kontrollkalb

Datum	RIT Gesamtöstrogene ng/ml Urin	Fluorimetrie Östrogene ng/ml Urin	Kreatinin mg/ml Urin	ng Gesamtöstrogene
				- RIT 1 mg Kreatinin
31.1.1972	2,46	-	0,03	80
1.2. 8.00	5,81	0,20	0,17	34
2.2.	3,24	1,30	0,15	22
4.2.	1,43	3,40	0,05	29
7.2.	2,29	2,00	0,04	57
8.2.	10,32	2,40	0,39	26
11.2.	4,81	5,70	0,16	30
14.2.	4,51	4,10	0,33	14
16.2.	5,52	1,00	0,19	29
18.2.	7,48	3,50	0,38	20
21.2.	6,55	5,20	0,43	15
23.2.	15,18	1,50	0,64	24
25.2.	7,86	6,60	0,54	15
28.2.	7,58	9,30	1,45	5
1.3.	6,95	7,40	0,43	16
3.3.	10,44	3,80	0,71	15
6.3.	16,79	11,40	1,55	11
8.3.	15,06	4,20	1,24	12

1.2. = Tag d. Behandlung

Tabelle 8

Östrogenausscheidung und Kreatininkonzentrationen im Urin beim

Versuchskalb

Datum		RIT Gesamtöstrogene ng/ml Urin	Fluorimetrie Östrogene ng/ml Urin	Kreatinin mg/ml Urin	ng Gesamt- Östrogene - RIT 1 mg Kreatinin
31.1.1972		7,66	- **	0,21	36
1.2.	8.00	4,68	0,86	0,06	78
1.2.	13.00	25,53	8,50	0,30	85
1.2.	16.30	20,63	14,59	0,47	44
2.2.		18,54	7,40	0,32	58
4.2.		26,60	14,50	0,47	57
5.2.		27,00	16,00	0,58	47
6.2.		34,44	16,70	0,83	41
7.2.		28,44	15,60	0,53	54
8.2.		- **	23,70	0,63	-
9.2.		24,52	12,40	0,29	85
10.2.		36,68	10,60	0,65	56
11.2.		21,71	8,60	0,12	164
12.2.		31,28	19,60	0,35	90
13.2.		56,62	38,00	0,81	70
14.2.		50,58	32,60	0,54	94
15.2.		48,22	13,50	0,83	58
16.2.		26,25	14,50	0,15	175
17.2.		49,98	36,20	0,63	79
18.2.		54,06	33,50	0,87	62
21.2.		30,13	17,70	0,42	72
22.2.		19,55	16,80	0,49	40
23.2.		53,72	33,60	2,99	54
24.2.		28,56	15,50	0,30	95
25.2.		59,04	69,10	1,35	47
26.2.		21,08	8,90	0,17	124
28.2.		43,79	27,50	1,13	39
29.2.		21,59	18,40	0,28	77
1.3.		32,10	10,50	0,65	49
2.3.		26,52	18,70	0,47	56
3.3.		39,36	48,40	1,58	25
6.3.		43,68	33,70	0,83	53
7.3.		39,44	82,70	2,05	19
8.3.		9,64	7,50	0,32	30

1.2. = Tag d. Behandlung

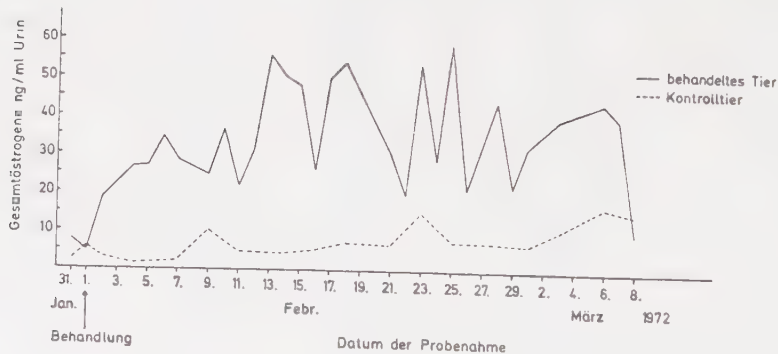
** = Probe abhanden gekommen

Zum Vergleich wurden die in den identischen Urinproben im gleichen Institut von Dr. VOGT auf fluorimetrischem Wege ermittelten Östradiol-17 β -Werte mit angegeben (siehe auch KARG et al. 1972 b); auf die Bedeutung der mit beiden Meßverfahren ermittelten Werte hinsichtlich der Charakterisierung der Spezifität der Methodik wurde bereits im Kapitel 3.1.4.2. eingegangen. In den Tabellen sind auch die im Urin ermittelten Kreatininwerte mit angeführt, sowie die Quotienten, die sich aus der Bezugnahme ng Gesamtöstrogene (RIT) pro mg Kreatinin ergeben.

Die in den Tabellen Nr. 7 und Nr. 8 angegebenen radioimmunologisch ermittelten Gesamtöstrogenwerte sind, bezogen auf 1 ml Urin, in Abb. Nr. 16 nochmals dargestellt.

Abb. 16

Gesamtöstrogenausscheidung im Urin (ng/ml) beim Kontroll- und beim Versuchskalb während der gesamten Versuchsdauer



Aus der Tabelle und noch deutlicher aus der Abb. Nr. 16 geht hervor, daß sich beim unbehandelten Kalb Schwankungen zwischen 1,43 und 16,79 ng Gesamtöstrogene/ml Urin zeigen; beim unbehandelten Kalb schwanken die Werte zwischen 4,68 und 59,04 ng Gesamtöstrogene pro ml Urin.

Beim unbehandelten Versuchskalb ist zunächst ein deutlicher Anstieg der Östrogenausscheidung unmittelbar nach der Behandlung festzustellen; etwa zwei Wochen nach der Implantation folgt eine Phase stark schwankender Werte. Es fällt auf, daß bereits vier Tage nach der Behandlung eine Konzentration erreicht ist, die sich bis zum Schlachttag, trotz starker Schwankungen von Tag zu Tag, grundsätzlich nicht mehr zu verändern scheint.

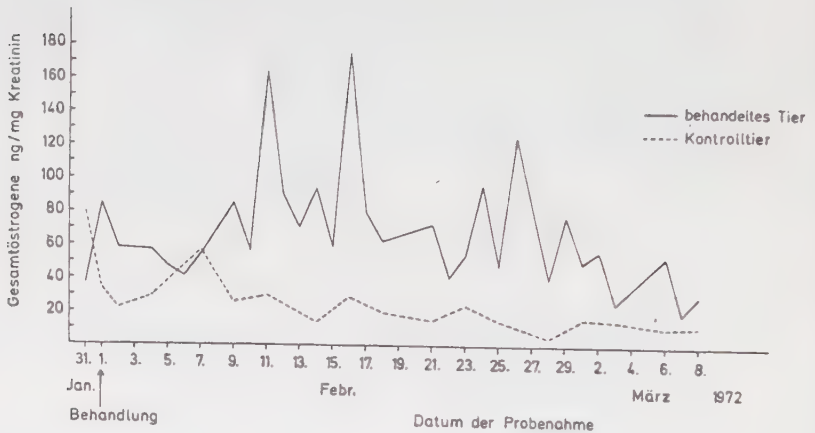
Beim Kontrollkalb treten keine so starken Schwankungen auf - die Werte lassen hier eher auf einen Anstieg der Östrogenausscheidung von Versuchsbeginn bis Versuchsende (s. Abb. Nr. 16) schließen. Weiterhin ist aus den Tabellen Nr. 7 und Nr. 8, sowie aus Abb. Nr. 16 zu erkennen, daß es bei der Bezugnahme Gesamtöstrogene/ml Urin - abgesehen vom Schlachttag (8.3.1972) - zu keiner Überschneidung zwischen den Werten des Kontroll- und des Versuchskalbes im Anschluß an die Behandlung kommt.

Zur weiteren Verdeutlichung des Ergebnisses wurden auch die in den Tabellen Nr. 7 und Nr. 8 angegebenen Bezugswerte ng Gesamtöstrogene pro mg Kreatinin graphisch dargestellt (siehe Abb. Nr. 17).

Bei Gegenüberstellung der Werte "ng Gesamtöstrogene/ml Urin" und "ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin" (siehe Tabellen Nr. 7 und Nr. 8; Abb. Nr. 16 und Nr. 17) zeigt sich, insbesondere beim Versuchskalb, daß die festgestellten starken Schwankungen in der Östrogensekretion bei Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/ml Urin", nach der Bezugnahme auf "ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin" eine gewisse Dämpfung erfahren haben.

Abb. 17

Gesamtöstrogenausscheidung im Urin bezogen auf
mg Kreatinin beim Kontroll- und beim Versuchskalb



Zudem ergibt sich für das Versuchskalb bei der Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin" - im Gegensatz zur Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/ml Urin" - unmittelbar nach der Behandlung zunächst kein Anstieg, eher sogar ein Abfall. Am Tag der Behandlung (Behandlung 1.2.1972, 9.00 Uhr) wurde um 16.30 Uhr der Wert 43 ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin gemessen und 6 Tage danach der von 41 ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin; erst am elften Tag nach der Behandlung erfolgte ein deutlicher Anstieg; gemessen wurde der Wert von 180 ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin.

Trotz dieser Unterschiede im Verlauf der Östrogenausscheidung, die sich bei der Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin", im Vergleich zur Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/ml Urin" zeigen, kommt es bei gleichzeitig vom Kontroll- und Versuchskalb gewonnenen Urinproben auch bei der Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin" nur in einem Fall (7.2.1972) zu einer Überschneidung der im Anschluß an die Behandlung gemessenen Werte. Aufgrund des Ausscheidungsverlaufes kann also auch hier (d.h. bei der Bezugnahme ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin) eindeutig zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier unterschieden werden.

Wird die Gesamtöstrogenausscheidung, bezogen auf "ng/mg Kreatinin", während der gesamten Versuchsdauer beim Versuchskalb und beim Kontrollkalb hinsichtlich einer Überschneidung betrachtet, so kann gesagt werden, daß in den Bereich "höchster Wert Gesamtöstrogenausscheidung vom Kontrollkalb und niedrigster Wert Gesamtöstrogenausscheidung vom Versuchskalb" 5 Meßwerte vom Kontrollkalb und 9 Meßwerte vom Versuchskalb fallen.

Weiterhin zeigt sich hier, bei Bezugnahme auf ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin (siehe Abb. Nr. 17), nicht nur für das Versuchskalb, sondern auch für das Kontrollkalb eine gewisse Verringerung der Östrogenausscheidung im Verlaufe des Versuches, anders also als bei der Bezugnahme "ng Gesamtöstrogene/ml Urin".

4.1.5. Ergebnisse der Östrogenbestimmung in der Follikelflüssigkeit

Die radioimmunologische Bestimmung des Gesamtöstrogengehaltes in der Follikelflüssigkeit führte zu folgenden Werten:

Kontrollkalb = 19,7 ng/ml Follikelflüssigkeit

Versuchskalb = 6,2 ng/ml Follikelflüssigkeit

Der Wert beim Kontrollkalb liegt um den Faktor 3 höher als beim Versuchskalb.

4.1.6. Ergebnisse der Bestimmung von Östron und Östradiol-17B im Muskelgewebe

Wie schon im Kapitel 3.1.3.3.2.1. erwähnt ist, wurden die Bestimmungen in einem vorzerkleinerten und gut durchgemischten Muskelgewebe durchgeführt.

Das Ergebnis von 16 Doppelbestimmungen von Östron und Östradiol-17B beim Kontroll- und beim Versuchskalb ist in Tabelle Nr. 9 aufgeführt.

Tabelle 9

Messungen von Östron und Östradiol-17B im
Muskelgewebe vom Kontrollkalb und vom Ver-
suchskalb

		ng/g Muskelgewebe			
		Kontrollkalb		Versuchskalb	
		Östron	Östradiol-17B	Östron	Östradiol-17B
Muskel-					
probe	1	0,38	0,92	0,19	5,02
	2	0,69	0,92	0,27	5,72
	3	0,66	0,92	0,18	5,16
	4	0,33	0,46	0,18	7,26
	5	0,37	0,60	0,22	3,29
	6	0,51	0,41	0,35	5,06
	7	0,62	0,46	0,18	5,50
	8	0,50	0,87	0,28	5,50
	9	0,65	0,22	0,28	6,52
	10	0,40	0,81	0,20	6,09
	11	0,11	0,18	0,20	3,34
	12	0,26	0,47	0,10	3,50
	13	0,61	0,43	0,13	7,38
	14	0,22	0,85	0,13	6,28
	15	0,06	0,47	0,15	5,73
	16	0,20	0,81	0,13	5,67
Mittelwert		0,41	0,61	0,19	5,50
Standard-		0,20	0,25	0,06	1,26
abw. $\pm$					

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, liegt dabei das Verhältnis der Mittelwerte von Östron : Östradiol-17B beim Kontrollkalb bei 1 : 1,5 und beim Versuchskalb bei 1 : 27,5.

Als Mittelwerte ergaben sich für Östron und Östradiol-17B beim Kontrollkalb 0,41 ($\pm$ 0,20) und 0,61 ($\pm$ 0,25) ng/g Gewebe.

Beim Versuchskalb lag der Mittelwert für Östron bei 0,19 ($\pm$ 0,06) und für Östradiol-17B bei 5,50 ($\pm$ 1,26) ng/g Muskelgewebe.

Dieser Unterschied zwischen den Östradiolkonzentrationen beim Kontroll- und beim Versuchskalb ist mit $p < 0,001$ hochsignifikant gesichert.

4.2. Ergebnisse stichprobenartiger Untersuchungen von Muskelproben von zwei graviden Kalbinnen

4.2.1. Fleischprobe einer Kalbin aus dem 2. Graviditätstrimester

Es handelt sich um einen Zufallsbefund vom Schlachthof.

Die Graviditätsdauer wurde durch die Messung der Scheitel-Steißlänge des Fötus ermitteln; sie betrug 14,5 cm, was einem Fötusalter von 4 Monaten entspricht.

Bei der Kalbin wurden Östron und Östradiol-17B im Muskelgewebe vom Halsgrat bestimmt.

In Tabelle Nr. 10 sind die Mittelwerte von 4 Doppelbestimmungen zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegt auch bei diesem Tier der Östronwert niedriger als der Östradiolwert, etwa um den Faktor 5,8.

Tabelle 10

Gehalt an Östron und Östradiol-17 β im Muskelgewebe
einer Kalbin im 2. Graviditätssemester

ng/g Muskelgewebe		
	Östron	Östradiol-17 β
Muskelprobe 1	0,050	0,200
2	0,050	0,200
3	0,050	0,410
4	0,060	0,360
Mittelwert	0,052	0,292
Standardabw.	0,005	0,109

4.2.2. Fleischprobe einer Kalbin aus der Endphase der Gravidität

Zur Untersuchung kam Muskelgewebe einer Kalbin, die in der Endphase der Gravidität (Ende letztes Trimester) stand. Es handelt sich auch hier um eine zufällig erhaltene Stichprobe. Auch hier wurden Östron und Östradiol-17 β bestimmt.

In Tabelle Nr. 11 sind die gemessenen Östron- und Östradiol-17 β -Werte aufgeführt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ergab sich für Östron ein Mittelwert von 2,095 ($\pm$ 0,133) ng/g Muskelgewebe.

Erstmals liegt hier also der Wert für Östron höher als für Östradiol, etwa um den Faktor 5,6.

Tabelle 11

Gehalt an Östron und Östradiol-17 β im Muskelgewebe
einer Kalbin in der Endphase der Gravidität

		ng/g Muskelgewebe	
		Östron	Östradiol-17 β
Muskelprobe	1	2,23	0,35
	2	1,96	0,35
	3	2,09	0,40
Mittelwert		2,09	0,37
Standardabw.		0,13	0,03

4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse im Muskelgewebe

Bei der Gegenüberstellung der errechneten Mittelwerte zeigt sich, wie aus Tabelle Nr. 12 ersichtlich, daß bei der Bestimmung von Östron insbesondere der bei einer Kalbin in der Endphase der Gravidität ermittelte Wert herausragt. Die Konzentration ist etwa 5 - 40 mal höher als bei den anderen untersuchten Tieren.

Bei Östradiol-17 β hebt sich der beim Versuchskalb ermittelte Wert von 5,50 ng/g Muskelgewebe ab; er liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie der Östronwert bei der Kalbin im letzten Graviditätssemester und ist um den Faktor 9 - 20 höher als die bei anderen Tieren gemessenen Östradiolkonzentrationen.

Tabelle 12

Zusammenfassung: Östrogenkonzentrationen in
Muskelgewebeproben unterschiedlicher Herkunft

Tier	ng/g Muskelgewebe	
	Östron	Östradiol-17 β
Kontrollkalb	0,41	0,61
Versuchskalb	0,19	5,50
gravide Kalbin 2.Grav.trim.	0,05	0,29
gravide Kalbin 3.Grav.trim.	2,09	0,37

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

Die Überlegungen, die zur Anwendung eines radioimmunologischen Verfahrens im Rahmen vorliegender Studien führten, wurden bereits in Kapitel 3.1.1.3. dargelegt. Ausschlaggebend waren die hohe Empfindlichkeit, die im pg-Bereich liegt (HOFFMANN 1972 a), sowie die zunächst nicht allzu schwer erscheinende Handhabbarkeit der Methodik.

Beide Kriterien waren wichtig. Einmal, um nicht nur Östrogene in der unmittelbaren Umgebung der Injektionsstelle, sowie im Urin messen zu können, sondern um auch in anderen, von der Injektionsstelle weiterabgelegenen Gewebepartien sowie im Plasma Messungen durchführen zu können. Zum anderen erschien es auch wichtig, soweit wie möglich auch bei nicht behandelten Kälbern die Konzentrationen endogen produzierter Steroidöstrogene im Muskelgewebe messen zu können, um eine Abgrenzung zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier herstellen zu können.

Das Kriterium Handhabbarkeit der Methodik erschien wichtig, um auch in einer angemessenen Zeit brauchbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Problematik der Zuverlässigkeit von radioimmunologischen Östrogenmessungen wird von HOFFMANN (1972) in seiner Habilitationsschrift eingehend diskutiert. Insbesondere das bei der Messung der Gesamtöstrogene auftretende Problem der Relevanz der erhaltenen Absolutwerte läßt sich auch auf die Plasma- und Urinuntersuchungen in vorliegender Arbeit übertragen.

Es sei hier nochmals zitiert, daß die Östrogenmessungen im Plasma während des Zyklus beim Rind zu einer einheitlichen physiologischen Aussage führten, obwohl Differenzen in den Absolutwerten auftraten; so lagen die während der Brunst gemessenen Maximalwerte im Durchschnitt bei 300 pg/ml Plasma (HOFFMANN & KARG 1971; HOFFMANN 1972 a,b) und waren nur wenig niedriger bei LINDNER (1971) und bei SHEMESH et al. (1972). Viel niedrigere Werte wurden dagegen bei HENRICKS et al. (1971), ECHTERNKAMP & HANSEL (1971) und GLENCROSS & POPE (1972) gemessen.

Auf die eigenen Untersuchungen übertragen bedeutet dies, daß bei Anwendung des beschriebenen Verfahrens die gemessenen Unterschiede zwischen behandeltem und unbehandeltem Kalb, oder auch die bei einem Tier auftretenden Schwankungen als physiologisch relevant anzusehen sind, obwohl hinsichtlich der absoluten Höhe noch gewisse Zweifel bestehen.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen konnten jedoch die Gesamtöstrogenwerte im Urin bis zu einem gewissen Grad auch in ihrer absoluten Aussage objektiviert werden; nachdem Urin ja in größeren Mengen zur Verfügung stand, war es möglich, hier im Parallelversuch eine fluorimetrische Messung durchzuführen. Die beiden auf verschiedenen Prinzipien beruhenden Messungen ergaben nicht nur in ihrer qualitativen (Ausscheidungsverlauf), sondern auch in ihrer quantitativen Aussage (Absolutwerte) eine Übereinstimmung (siehe Kapitel 4.1.4.). Entgegen den Erwartungen stieß die Östrogenbestimmung im Muskelgewebe zunächst auf große Schwierigkeiten. So ergab die Bestimmung der Gesamtöstrogene in dem primären Ätherextrakt eines Muskelhomogenates kein sinnvolles Ergebnis, ebenso wenig wie nach Erweiterung des Extraktionsganges und Bestimmung der Gesamtöstrogene in der phenolischen Fraktion. In beiden Fällen lagen die Werte unabhängig vom Tier und der Probe konstant bei 1,0 ng/g Muskelgewebe. Erst nach einer nochmaligen Erweiterung des Extraktionsganges durch Einführen eines säulenchromatographischen Reinigungsschrittes, wobei es zur Trennung von Östron und Östradiol kommt, konnten diese Schwierigkeiten überwunden werden.

Dieser chromatographische Schritt, der eine wesentliche Erhöhung der Spezifität der Methodik mit sich brachte, ermöglichte also auch die getrennte Erfassung von Östron und Östradiol; durch den Einsatz hochselektiver Antisera konnte die Spezifität der Methodik nochmals erhöht werden.

Um eine endgültige Aussage hinsichtlich der Spezifität machen zu können, sind jedoch auch hier Messungen mit einem Referenzverfahren notwendig.

Bei vorliegender Untersuchung konnte Östradiol-17 β sowohl mit dem RIT als auch mit einem Fluoreszenzverfahren beim Versuchskalb gemessen werden. Die relativ gute Übereinstimmung der beiden Meßwerte um 5 ng/g Muskelgewebe (siehe Kapitel 4.1.6.) zeigt, daß in diesen relativ hohen Konzentrationsbereichen die Spezifität der Methodik als gesichert gelten kann. Hinsichtlich der relativ niedrigen Meßwerte von Östron und Östradiol-17 β im Muskelgewebe vom unbehandelten Kalb und von Östron auch beim behandelten Kalb muß jedoch gesagt werden, daß ein entsprechendes Referenzverfahren derzeit noch nicht zur Verfügung steht. Außerdem muß bei diesen niedrigen Meßwerten in Betracht gezogen werden, daß die Messung durch noch mitextrahierte Verbindungen aus dem Gewebe beeinflusst werden kann.

Die untere Empfindlichkeit der Methodik (siehe Kapitel 3.1.4.1.) wurde hier nach der Höhe des Reagentienleerwertes festgelegt. Tatsächlich wäre es jedoch notwendig, hierzu einen "Gewebeleerwert" heranzuziehen. Nachdem uns bisher jedoch aus operationstechnischen Gründen ein steroidhormonfreies Kalb, d.h. ein gonad- und adrenalektomiertes Kalb, noch nicht zur Verfügung stand, kann zu diesem Punkt vorläufig nicht Stellung genommen werden.

Trotz dieser gewissen, in einigen Punkten die Spezifität der angewandten Methode betreffenden Vorbehalte, muß doch gesagt werden, daß mit der radioimmunologischen Östrogenbestimmung im Rahmen der Rückstandsanalytik erstmals eine Methodik zur Verfügung steht, die den oben gestellten Ansprüchen an Empfindlichkeit und Ausführbarkeit sehr nahe kommt. Dies ergibt sich auch daraus, daß bei Überprüfung der weiteren Zuverlässigkeitskriterien, (Genauigkeit und Reproduzierbarkeit,) in jedem Falle relevante Ergebnisse erzielt worden sind (siehe Kapitel 3.1.4.1.).

Zusammenfassend kann zur Methodik gesagt werden, daß sie zwar weit voran getrieben werden konnte, die Entwicklung aber noch nicht abgeschlossen ist; dies wird sich erst bei Anwendung im Routinetest ergeben.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Vorweggenommen sei, daß auch bei vorliegendem Modellversuch an zwei Mastkälbern der anabole Effekt beim Versuchskalb deutlich zutage trat, wenn auch diese Aussage weder der Fragestellung entspricht noch gesichert werden kann.

Die Bestimmung der Gesamtöstrogene im peripheren Plasma verlief hinsichtlich der Aussage "behandeltes oder nicht behandeltes Kalb" unbefriedigend. Erstaunlich sind zunächst die gemessenen hohen Werte beim Kontrollkalb; sie liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie die von HOFFMANN (1972a) mit der gleichen Methode gemessenen Werte beim erwachsenen Rind in der Gelbkörperphase des Zyklus.

Eine mögliche Erklärung für diese relativ hohen Östrogenwerte im Plasma des Kontrollkalbes bietet zunächst die Tatsache, daß ja auch die Nebennierenrinde in der Lage ist, erhebliche Östrogenmengen zu produzieren. Die Produktion von Östrogenen in der Nebennierenrinde beim erwachsenen Rind wurde von PEARSON (1965) nachgewiesen. Entsprechende Untersuchungen für das Kalb liegen nicht vor, es darf jedoch angenommen werden, daß, ähnlich wie beim Kind, die Nebennierenrinde ebenfalls Östrogene produziert; wie BIDLINGMAIER et al. (1973) bei Kindern zeigen konnte, handelt es sich hier im wesentlichen um das biologisch weniger aktive Östron. Auf die Beteiligung der Nebennierenrinde an der Östrogenproduktion (dabei handelt es sich ebenfalls in erster Linie um Östron) weisen auch SAEZ et al. (1972) bei Erwachsenen hin.

Im vorliegenden Fall kann aber auch mit Sicherheit von einer ovariellen Östrogenproduktion gesprochen werden; dies kann damit begründet werden, daß beim Kontrollkalb an beiden Ovarien bei der Schlachtung linsen- bis erbsengroße Follikel gefunden wurden, in deren Flüssigkeit eine Konzentration von 19,7 ng Gesamtöstrogene pro ml Follikelflüssigkeit gemessen wurde.

Beim behandelten Kalb liegen die gemessenen Werte, bezogen auf ml Plasma, in fast allen Fällen höher als beim Kontrollkalb. Da jedoch bereits vor der Behandlung höhere Werte gefunden wurden, läßt diese auf den ersten Blick eindeutige Feststellung keine Aussage zu, ob es sich um ein behandeltes oder unbehandeltes Kalb handelt. Im Gegensatz zu den Befunden im Urin (siehe unten und Kapitel 4.1.4.) kann beim behandelten Kalb (Versuchskalb) bei den Gesamtöstrogenwerten im Plasma nicht von einer Ausscheidungskurve gesprochen werden. Hier ergab sich während der gesamten Untersuchungsdauer keine Konzentrationsverschiebung. Dies kann nur dadurch erklärt werden, daß konstant Östrogene in die Blutbahn abgegeben werden (endogener und exogener Provenienz). Letztlich spricht dafür auch die Tatsache, daß bei der Schlachtung noch erhebliche Mengen des Implantats (50 %) aufgefunden wurden, wobei trotz bindegewebiger Abkapselung eine weitere Hormonabgabe angenommen werden muß. Eine erhöhte Abgabe in die Blutbahn wird durch eine vermehrte Ausscheidung im Urin ausgeglichen, was auch aus den vorliegenden Urinwerten hervorgeht. Dadurch kann im Sinne der Homöostase ein relativ konstanter Blutspiegel gehalten werden. Während beim Kontrollkalb größere Follikel im Ovar gefunden wurden, war dies beim Versuchskalb nicht der Fall. Auch war die Östrogenkonzentration in der Follikelflüssigkeit des Versuchskalbes erheblich niedriger als beim Kontrollkalb. Dies könnte als Zufallsbefund gewertet werden; es ist jedoch daran zu denken, daß im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus die endogene Östrogenproduktion durch die exogene Zufuhr gehemmt wurde.

Für die Bewertung der im Urin gemessenen Gesamtöstrogenkonzentrationen bieten sich zwei Bezugsgrößen an; einmal die Bezugnahme auf Volumen (ng/ml Urin) und zum anderen auf Kreatinin (ng/mg Kreatinin). Zur Bezugnahme auf ng Gesamtöstrogene/ml Urin muß gesagt werden, daß es sich hier um einen Meßparameter handelt, der starken Schwankungen unterworfen ist. So schwankt bei Mestkälbern das Harnminutenvolumen zwischen 2 bis 45 ml/Minute, gemessen in einem Zeitraum von 24 Std. (BOEHNCKE 1971). Eine etwa zu treffende Aussage ist mit einer großen

Unsicherheit von vorneherein belastet. Es ist deshalb allgemein üblich, den 24-Stunden-Urin zu sammeln und in einem aliquoten Teil davon die Östrogenbestimmung durchzuführen.

Wenn es aus technischen Gründen nicht möglich ist, diesen 24-Stunden-Urin zu sammeln, so hat es sich eingebürgert, den Meßwert auf mg Kreatinin zu beziehen. RICHTERICH (1971) schreibt: "Es ist bis heute keine Substanz bekannt, die so diureseunabhängig in mg/min. ausgeschieden wird, wie Kreatinin". Auch für das Rind wurde die Bezugnahme auf mg Kreatinin schon vor einiger Zeit adaptiert (RANDEL & ERB 1971; RANDEL et al. 1971).

Für das Mastkalb scheint sich dieser Parameter ebenfalls zu eignen, da, wie BOEHNCKE berichtet (pers. Mitteilung), auch hier eine konstante, diureseunabhängige Kreatininausscheidung erfolgt. Kreatinin ist ein Stoffwechselprodukt von Kreatin (LEUTHARDT 1961). Dieses wird im Aminosäurestoffwechsel in Nieren und Leber gebildet, von wo es in die Muskelzellen gelangt. Dort dient es als Kreatinphosphat der Energiespeicherung. Durch Dehydratisierung wird irreversibel das innere Anhydrid des Kreatins, das Kreatinin, gebildet und über die Nieren ausgeschieden. Als Parameter für den Stickstoff-Stoffwechsel kann Kreatinin nicht herangezogen werden.

In vorliegender Arbeit wurden zu Vergleichszwecken beide Bezugsgrößen herangezogen.

Bei beiden Bezugnahmen zeigt sich bei der Gegenüberstellung Kontrollkalb- und Versuchskalb deutlich der Effekt der Implantation; es ergeben sich jedoch Unterschiede im Ausscheidungsverlauf. So läßt sich bei Bezugnahme auf Volumen (ml Urin) sofort eine stark erhöhte Ausscheidung an Gesamtöstrogenen feststellen, während bei Bezugnahme auf mg Kreatinin dieser starke Anstieg der Gesamtoöstrogenausscheidung erst nach 10 Tagen festzustellen ist. Ein ähnliches Bild der Östrogenausscheidung im Urin, wie hier bei der Bezugnahme auf mg Kreatinin, ergibt sich aus Untersuchungen von KARG et al. (1970) bei Bestimmung der Östrogene im 24-Stunden-Urin.

Aus den durchgeführten Gesamtöstrogenbestimmungen im Urin von Kontroll- und Versuchskalb zeigen sich bei Betrachtung der Meßwerte unabhängig vom Zeitpunkt der Probenentnahme doch gewisse Überschneidungen zwischen beiden Tieren (siehe Kapitel 4.1.4.). Daraus läßt sich folgern, daß stichprobenartige Bestimmungen im Urin also nicht unbedingt eine Aussage zulassen, ob es sich um ein behandeltes oder unbehandeltes Kalb handelt.

Bei Anwendung des beschriebenen Verfahrens, das in Kapitel 5.1. bereits ausführlich diskutiert wurde, gelang es erstmals mit relativ hoher Zuverlässigkeit Östrogenbestimmungen nicht nur im Gewebe von behandelten Tieren, sondern auch im Gewebe von einem unbehandelten Kalb durchzuführen. Damit ist, zumindest theoretisch, erstmals die Möglichkeit gegeben, auf quantitativem Wege zwischen endogen produzierten und exogen zugeführten Steroidöstrogenen zu unterscheiden. Trotz der gegebenen methodischen Zuverlässigkeit kann den durchgeführten Östrogenbestimmungen im Muskelgewebe aufgrund des geringen Tiermaterials nur eine beschränkte Aussagefähigkeit zugesprochen werden.

In vorliegendem Falle wurde noch am Tag der Schlachtung beim Versuchskalb der relativ hohe Wert von 5,5 ng Östradiol/g Muskelgewebe (siehe Kapitel 4.1.6.), wahrscheinlich infolge der Östrogenbehandlung, gemessen; um den Faktor 27,5 niedriger liegt dagegen der Östradiol-17 β -Wert beim Kontrollkalb.

Ein eher gegenteiliger Effekt trat bei der Messung von Östron auf; beim Kontrollkalb lag der gemessene Wert (Mittelwert) bei 0,41 ng Östron/g Muskelgewebe, beim behandelten Kalb lag er mit 0,19 ng Östron/g Muskelgewebe noch etwas niedriger. Ob es sich hier um einen echten Unterschied handelt, kann bei nur zwei Tieren nicht gesagt werden. Es wäre vielleicht zu diskutieren, ob beim behandelten Kalb infolge des vermutlich ausgelösten Rückkoppelungsmechanismus die ovarielle Östrogenproduktion stark gedrosselt ist und lediglich die Nebennierenrinde als maßgebliche Östronquelle anzusehen ist.

Der Wert von 5,6 ng Östradiol-17 β /g Muskelgewebe beim behandelten Kalb 36 Tage nach der Implantation ließ uns zunächst an der angewandten Methode zweifeln; er konnte jedoch durch eine fluorimetrische Messung abgesichert werden.

Es ist jedoch fraglich, ob diesem hohen Wert eine allgemeine Bedeutung beizumessen ist, da bei weiteren diesbezüglichen Untersuchungen am Institut (HOFFMANN et al., unveröffentlichte Ergebnisse) keine Bestätigung hierfür erhalten wurde. Ergänzend muß jedoch gesagt werden, daß in den eben zitierten weiteren Tierversuchen die Schlachtung erst 78 Tage nach der Implantation erfolgte, während sie im vorliegenden Fall nach 36 Tagen erfolgte.

Die Erfassung von als physiologisch anzusprechenden Östrogenkonzentrationen im Muskelgewebe zweier gravidier Kalbinnen ergab Werte, die im Fall von Östron teilweise in der Größenordnung des beim behandelten Kalb ermittelten Östradiol-17 β -Wertes lagen. Die Östrogenkonzentration von ca. 2 ng/g Muskelgewebe, die bei einer Kalbin im 3. Graviditätssemester gemessen wurde, läßt sich leicht durch den in dieser Zeit sehr hohen Östronspiegel im peripheren Blut erklären (HOFFMANN & KARG 1971; HOFFMANN et al. 1973; EDQVIST et al. 1972).

5.3. Allgemeine Diskussion

Mit vorliegender Arbeit sollte im Rahmen eines Modellversuches an zwei weiblichen Mastkälbern zur Klärung des Problems beigetragen werden, inwieweit es möglich ist, eine Behandlung mit Steroid-östrogenen (Östradiolbenzoat) nachzuweisen.

Im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden kam hier erstmals ein neu entwickeltes, hochempfindliches radioimmunologisches Verfahren zur Anwendung, auf dessen Verwendbarkeit im Rahmen der Rückstandsanalytik erstmals HOFFMANN & KARG (1973) hingewiesen haben.

Anders als bei der Bestimmung von synthetischen Östrogenen (z.B. DÄS), deren Nachweis ja gleichzeitig als Beweis für eine Fremdstoffzufuhr angesehen werden kann, ist bei der Erfassung von körpereigenen Steroidöstrogenen der Nachweis für eine mögliche Behandlung nur auf quantitativem Wege zu erbringen.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen konnte aufgrund der Östrogenbestimmung im peripheren Plasma nicht zwischen behandeltem und unbehandeltem Kalb unterschieden werden. Dagegen zeigte die Bestimmung der Östrogenausscheidung im Urin in den meisten Stichproben höhere Werte beim behandelten Kalb. Aufgrund der jedoch festgestellten Konzentrationsüberschneidungen beim behandelten und beim unbehandelten Kalb während des gesamten Untersuchungszeitraumes können stichprobenartige Steroidöstrogenuntersuchungen im Urin aber zu keiner eindeutigen Aussage führen.

Auch die Östrogenbestimmungen im Muskelgewebe verschiedenen Ursprungs zeigten, daß sich Überschneidungen von behandelten und unbehandelten Tieren ergeben. Aufgrund der spezifischen Messung einzelner Östrogene scheint die angewandte Methode hier jedoch eine Differenzierung zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier zu gestatten. Die Praktikabilität wird sich jedoch erst in der Routineanwendung erweisen.

Zur weiteren Beurteilung der vorliegenden Situation sollten auch noch die folgenden physiologisch-endokrinologischen Gesichtspunkte herangezogen werden; bei den Steroidöstrogenen handelt es sich, einheitlich bei allen Säugetierspezies um notwendige körpereigene Wirkstoffe, die sowohl beim männlichen wie auch beim weiblichen Individuum im geschlechtsreifen und auch im noch nicht geschlechtsreifen Organismus vorkommen.

Der Organismus von Tier und Mensch versteht also mit diesen Substanzen umzugehen. Eine echte schädliche Wirkung wird sich nur unter ungewöhnlichen Umständen zeigen, z.B. wenn sehr hohe Dosen über einen längeren Zeitraum aufgenommen werden, wie es gelegentlich als gewerbetoxikologisches Problem auftreten kann. Aber auch

hier handelt es sich in den meisten Fällen um reversible Effekte (KARG 1973). In Relation zu diesen Dosierungen und auch zu den Mengen, die von vielen Frauen freiwillig mit der kontrazeptiven Pille aufgenommen werden (50 µg eines oral wirksamen Steroid-östrogens pro Tag), sowie zu den Mengen (ca. 200 - 400 µg), die von einer Frau täglich produziert werden (NOCKE-FINCK & BREUER 1972), können die, wie vorliegende Untersuchungen zeigen, mit der Nahrung aufgenommenen Mengen nur als Spuren bezeichnet werden.

Daraus resultierend erscheint es sinnvoller, statt ein generelles Verbot der Anwendung von östrogenwirksamen Substanzen aufrecht erhalten zu wollen, eine kontrollierte Anwendung vorzuschlagen. Dabei müssen natürlich Differenzierungen hinsichtlich der eingesetzten Präparate getroffen werden, sowie allgemein gültige Toleranzgrenzen für Östrogenkonzentrationen im Gewebe aufgestellt werden. Im Rahmen einer möglicherweise kontrollierten Anwendung solcher Präparate müßte auch besonderes Augenmerk auf die Art der Applikation gelegt werden. Hier sollten nur solche Körperpartien in Frage kommen, die bei der Schlachtung automatisch verworfen werden, z.B. die Falte am Ohrgrund, es sei denn, vom Hersteller wird eine Form der Galenik gewählt, die eine vollständige Resorbierbarkeit des Präparates innerhalb des Behandlungszeitraumes garantiert.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen eines Modellversuches mit zwei weiblichen Mastkälbern, von denen eines mit einem Kombinationspräparat aus Östradiolbenzoat und Trenbolonacetat als Anabolikum behandelt worden war, wurden im Verlauf des Tierversuches Blutplasma und Urin, sowie im Anschluß an die Schlachtung Muskelgewebe und Follikelflüssigkeit auf ihren Östrogengehalt mit einem radioimmunologischen Meßverfahren, untersucht.

Während in Plasma, Follikelflüssigkeit und Urin, letzterer wurde zuvor noch einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen, nach einfacher Ätherextraktion die Gesamtöstrogene bestimmt wurden, mußte für die Östrogenbestimmung im Muskelgewebe aus Spezifitätsgründen ein aufwendigeres Verfahren entwickelt werden. Hier wurden nach einer primären Ätherextraktion des Gewebehomogenates, Gewinnung der phenolischen Fraktion und nachfolgender säulenchromatographischer Trennung von Östron und Östradiol auf Sephadex LH 20, die beiden Hormone getrennt unter Verwendung hochspezifischer Antisera gemessen. Die beiden Antisera waren jeweils gegen das C6-konjugierte Östrogen gerichtet.

Die Bestimmung der Gesamtöstrogene im peripheren Blutplasma führte hinsichtlich der Aussage "behandeltes" oder "unbehandeltes" Kalb zu keinem klaren Ergebnis; so lagen die Plasmakonzentrationen beim behandelten Kalb insgesamt höher als beim unbehandelten Kalb (Mittelwert unbehandeltes Kalb 0,121 ng/ml Plasma; Mittelwert behandeltes Kalb 0,251 ng/ml Plasma); dies gilt jedoch auch für die Periode vor der Implantation.

Im Urin dagegen ergibt sich für das behandelte Kalb eine klare Östrogenausscheidungskurve, die eine Differenzierung zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier ermöglicht. Dies gilt sowohl für die Bezugnahme ng Gesamtöstrogene/ml Urin als auch für die Bezugnahme ng Gesamtöstrogene/mg Kreatinin. Einzelne Stichproben

scheinen jedoch keine klare Aussage zuzulassen, da sich bei Betrachtung der Meßwerte unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme Überschneidungen der Gesamtöstrogenwerte beim behandelten und unbehandelten Kalb ergeben.

Der Nachweis von Steroidöstrogenen in der Follikelflüssigkeit eines nicht behandelten Kalbes zeigt, daß bei der Spezies Rind schon in sehr frühem Alter eine ovarielle Östrogenproduktion stattfindet.

Im Muskelgewebe gelang es erstmals nicht nur bei einem behandelten Kalb, sondern auch bei einem unbehandelten Kalb Östrogene zu bestimmen. Der beim behandelten Kalb gemessene Östradiol-17 β -Wert von 5,5 ng/g Muskelgewebe 36 Tage nach der Implantation, liegt um das 27,5-fache höher als der entsprechende Wert beim unbehandelten Tier. Aufgrund des beschränkten Tiermaterials kann diesem Einzelwert, der methodisch abgesichert werden konnte, jedoch keine allgemeine Bedeutung zugemessen werden, zumal sich in später durchgeführten Feldversuchen, wobei die Tiere allerdings 78 Tage nach der Implantation geschlachtet wurden, keine gesicherten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Kälbern ergaben.

Relativ hohe Werte, besonders von Östron (maximal 2,095 ng Östron pro g Muskelgewebe), wurden im Muskelgewebe von Kalbinnen gemessen, die während der Gravidität geschlachtet worden waren.

Es wird diskutiert, daß es aufgrund der Empfindlichkeit des angewandten radioimmunologischen Verfahrens sehr wohl möglich ist, auf quantitativem Wege zwischen endogen produzierten und exogen zugeführten Östrogenen zu unterscheiden; da jedoch Überschneidungen bei den bei behandelten und unbehandelten Tieren gemessenen Werten gefunden werden, wird bei stichprobenartigen Untersuchungen nur in Sonderfällen eine eindeutige Aussage hinsichtlich "behandelt" oder "unbehandelt" gemacht werden können.

Es erscheint daher sinnvoller, statt ein absolutes Verbot der Östrogenanwendung zu erlassen, eher von Toleranzgrenzen zu sprechen.

S u m m a r y

A pilot experiment was carried out with two female calves, one of which was treated with a combination drug containing estradiol-benzoate and trenbolone acetate as anabolic agents. During the experimental period the estrogen levels in plasma, urine, muscle tissue and follicular fluid were analysed in both calves by means of a radioimmunoassay.

Whereas in plasma, follicular fluid and urine - the latter had to be hydrolyzed enzymatically before the extraction - the total estrogens were measured after a simple ether extraction, the measurement of estrogens in muscle tissue had to be done in a more complex manner because of specificity reasons. After the ether extraction of the muscle homogenate, the phenolic fraction was obtained and the estrogens were then separated by column chromatography (Sephadex LH 20). Both estrone and estradiol were measured using highly specific antisera raised against C6 conjugated estrogens.

The measurement of the total estrogens in peripheral plasma did not give a clear differentiation between the treated and untreated calf. The plasma concentration of total estrogens in the treated calf was generally higher than that of the untreated one (0.121 ng/ml vs 0.251 ng/ml). This, however, was also true during the time before treatment.

The urine on the other hand showed a clear excretion curve as to the treated calf, thus permitting a differentiation between the treated and untreated one. This is true both with reference to ng total estrogens/ml urine and to ng total estrogens/mg creatinine. However, the treated calf and the control calf could not be distinguished from each other when comparing the results obtained from single samples without regard to the time of collection. This was due to some overlapping of the values.

The presence of steroidal estrogens in follicular fluid in the control calf shows that ovarian estrogen production takes place at an early age in the bovine species.

It was succeeded for the first time in measuring estrogens in muscle not only in an estrogen treated calf but also in an untreated one. The level of estradiol-17 β (5.5 ng/g) in the treated calf 36 days after implantation was 27.5 times higher than the corresponding value in the untreated animal. Although being methodologically accurate, only limited significance in a biological sense can be attributed to this single value because of the reduced number of experimental animals; especially since no significant difference could be shown between the treated calves and control calves in trials conducted under field conditions, but it should be noted that in this case the animals were slaughtered 78 days after implantation. Relatively high values particularly in the case of estrone (maximum 2.095 ng estrone/g muscle) were measured in muscle tissue of cows slaughtered during gravidity.

Due to the high sensitivity of the radioimmunoassay which was used, it seems possible to make a quantitative differentiation between endogenously produced and exogenously administered estrogens. Nevertheless, the overlapping of values from the treated animal and the control animal will make it difficult to distinguish them from each other when only single sample collections are done. Hence it would be more reasonable to speak of tolerance values instead of strictly forbidding the administration of estrogenic hormones.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Abraham G.E., Tait A.D. 1971
Ovarian metabolism of steroid hormones.
In: Research in reproduction, Vol. 3
Edwards R.G., Ed.
The International Planned Parenthood Federation,
18-20 Lower Regent Street, London S.W.1
- Adlercreutz H., Luukainen T. 1965 a
Gaschromatographic studies on oestrogens in the bile of
pregnant women.
Biochim. Biophys. Acta 97, 134
- Adlercreutz H., Luukainen T. 1965 b
Isolation and identification of 17 α -oestradiol in the
'bile of a pregnant cow.
J. Reprod. Fert. 9, 137
- Adreus F.N., Stob M., Perry T.W., Beeson W.M. 1956
The effect of oral and subcutaneous estrogen and androgen
administration on growth and carcass quality of lambs.
J. Anim. Sci. 15, 575
- Attal J., Eik-Nes K.B. 1968
Measurement of free estradiol-17 β in blood-plasma by
gas-liquid chromatography using an electron capture
detector.
Anal. Biochem. 26, 398

Baird D.T. 1968

A method for the measurement of estrone and estradiol-17 β in peripheral human blood and other biological fluids using 35S-pipsyl chloride.
J. Clin. endocr. 28, 244

Barth K., Karg H. 1960

Untersuchungen über die Wirkungen von Diäthylstilböstrol- und Hydroxycin-Zusätzen bei der Mast von Jungbullen.
Z. Tierphysiol., Tierern., Futtermittelkunde 15, 236

Bauld W.S. 1954

Some errors in the colorimetric estimation of oestriol, oestrone and oestradiol by the Kober reaction.
Biochem. J. 56, 426

Beck A.B., Braden A.W. 1951

Studies on the oestrogenic substance in subterranean clover.
Aust. J. Exp. Med. Sci. 29, 297

Beeson W.M., Andrews F.N., Perry T.W., Stob M. 1955

The effect of orally administered stilbestrol and testosterone on growth and carcass composition of swine.
J. Anim. Sci. 14, 475

Beeson W.M., Andrews F.N., Stob M., Perry T.W. 1956

The effects of oral estrogens and androgens single and in combination on yearling steers.
J. Anim. Sci. 15, 679

Bickoff E.M., Booth A.N., Lyman R.L., Livingstone A.L.,

Thompson C.R., Deeds F. 1957
Coumestrol, a new estrogen, isolated from forage crops.
Science 126, 969

Bickoff E.M., Lyman R.L., Livingston A.L., Booth A.N. 1958

Characterisation of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen.
J. Americ. Chem. Soc. 80, 2002

- Bickoff E.M. 1961
Estrogen-like substances in plants.
Proc. 22nd Biology Colloquium, Physiology of Reproduction
Oregon State University 93
- Bidlingmaier F., Wagner-Barnack M., Butenandt O., Knorr D. 1973
Plasma estrogens in childhood and puberty under physio-
logical and pathological conditions.
Pediatric Research (eingereicht)
- Boehncke E. 1971
Methodische Studien zur Elektrolytausscheidung bei
männlichen Saugkälbern und Jungbullen.
Med. vet. Diss., München
- Bradbury R.B., White D.E. 1951
The chemistry of subterranean clover, isolation of
formononetin and genistein.
J. Chem. Soc. S. 3447
- Bradbury R.S., White D.E. 1954
The chemistry of subterranean clover, synthesis and
reduction of isoflavones related to genistein and
formononetin.
J. Chem. Soc. S. 871
- Braude R. 1947
Stimulation of growth and fattening of pigs by synthetic
estrogens.
British J. Nutr. 1, 3
- Brown J.B. 1955
A chemical method for the determination of oestriol,
oestrone and oestradiol in human urine.
Biochem. J. 60, 185

- Brown R.G. 1973
Ausscheidungsstudie über Zeranol.
Tierärztl. Umschau 28, 176
- Brüggemann J., Barth K., Karg H. 1958
Versuche zum Einsatz von Sexualhormonen in der Rindermast.
Z. Tierphysiol, Tierern., Futtermittelkunde 13, 321
- Burke C.W., Anderson D.C. 1972
~~Sex-hormone-binding~~ globulin is an oestrogen amplifier.
Nature 240, 38
- Burroughs W., Culbertson C.C., Kastelic J., Cheng E., Hale W.H. 1954
The effects of trace amounts of diethylstilbestrol in the
ration of fattening steers.
Science 120, 66
- Burroughs W., Culbertson C.C., Cheng E., Hale W.H., Homeyer P. 1955
The influence of oral administration of diethylstilbestrol
to beef cattle.
J. Anim. Sci. 14, 1015
- Bush L.I., Rauber H.W. 1963
Effects of feeding diethylstilbestrol on the development
and reproductive performance of dairy cattle.
J. Dairy Sci. 46, 740
- Bülenandt A., Jakobi H. 1933
Über die Darstellung eines kristallisierten pflanzlichen
Tokokinins (Thelykinin) und seine Identifizierung mit dem
Follikelhormon.
Hoppe Seyler's Zt. 218, 104

- Butenandt A., Jakobi H. 1940
Zur Charakterisierung des östrogen wirksamen Tokokinins
aus *Butea superba*.
Naturwissenschaften 28, 533
- Clegg M.T., Cole H.H. 1954
The action of stilbestrol on growth response in ruminants.
J. Anim. Sci. 13, 108
- Curnow D.H., Robinson T.W., Underwood E.J. 1948
Oestrogenic Action of extracts of subterranean clover.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26, 171
- Curnow D.H. 1954
Oestrogenic activity of subterranean clover. The isolation
of genistein from subterranean clover and methods of
quantitative estimation.
Biochem. J. 58, 283
- Curnow D.H., Rossiter R.C. 1955
Occurrence of genistein in subterranean clover and other
Trifolium species.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 33, 243
- Dinusson W.E., Andrews F.N., Beeson W.M. 1950
The effects of stilbestrol, testosterone, thyroid
alteration and spaying on growth and fattening of
beef heifers.
J. Anim. Sci. 9, 321
- Dinusson W.E., Klostermann E.W., Buchanan M.L. 1951
Stilbestrol, effect of subcutaneous implantation on
growing-fattening swine.
J. Anim. Sci. 10, 885

- Dodds E.C., Colberg L., Lawson E., Robinson R. 1938
Oestrogenic activity of certain synthetic compounds.
Nature 141, 247
- Dohrn M., Faure W., Poll H., Blotevogel W. 1926
Tokokinine, Stoffe mit sexualhormonartiger Wirkung aus
Pflanzenzellen.
Med. Klinik 22, 1417
- Eberlein W.R. 1969
The measurement of low levels of estrone and estradiol-17 β
in urine, employing ionexchange, thin-layer and gas liquid
chromatography.
Steroids 14, 553
- Echternkamp S.E., Hansel W. 1971
Plasma estrogens, luteinizing hormone and corticoids in
postpartum cows.
J. Dairy Sci. 54, 800
- Edqvist L.E., Ekman L., Gustafsson B., Jacobsson S.O.,
Johansson E.D.B., Lindell J.O. 1972
Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone in
pregnant cows treated with dexamethasone.
Acta endocr. (Kbh.) 71, 731
- Eechaute W. 1969
Determination of the total steroid-oestrogen concentration
in calf urine.
Thesis, Univ. Utrecht
- El-Attar T.M.A., Turner W.C. 1957
Spectrophotofluorimetric determination of estrogens in urine
and feces of cows during different stages of pregnancy.
Miss. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 641

Ellis D.I., 1970

Experimental procedures for the study of the rat uterine
estrogen receptor.

Unpublished data

Engel L.L. 1963

Physical properties of the steroid hormones.

Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris

Erb R.E., Randel R.D., Mellin T.N., Estergreen V.L.Jr. 1968

Urinary estrogen excretion rates during pregnancy in
the bovine.

J. Dairy Sci. 51, 416

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S. 1957

Steroid-protein conjugates

I. Preparation and characterisation of conjugates of
bovine serum albumin with testosterone and corticosterone.

J. Biol. Chem. 228, 713

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S. 1959

Steroid-protein conjugates

II. Preparation and characterisation of conjugates of
bovine serum albumin with progesterone, desoxycortico-
sterone and estrone.

J. Biol. Chem. 234, 1090

Exley D., Johnson M.W., Dean P.D.G. 1971

Antisera highly specific for 17 β -oestradiol.

Steroids 18, 605

Ganong W.F. 1965

Review of medical physiology.

2. Auflage

Lange Medical Publications, Los Altos, California

Gassner F.X., Martin R.P., Alego W.I. 1959

Hormone in der Tiermast.

6. Symposion d. dtsh. Gesellschaft f. Endokrinologie, Kiel
Springer-Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg, S. 151

Glascok R.F., Smith R.W. 1970

A study of the metabolism of phenolic oestrogen in
ruminant.

II. Chemical fractionation of radioactivity recovered
from various tissues after injection with tritiated
hexoestrol.

Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 10, 343

Glencross R.G., Pope G.S. 1972

Concentration of oestrogens in jugular-venous plasma of
cows during the oestrus cycle.

Biochem. J. 128, 81

Goodfriend L., Sehon A.H. 1970

Early approaches to production, analysis and use of
steroid specific antisera.

In: Immunological methods in steroid determination.

Péron F.G. and Caldwell B.V., Eds.

Appleton-Century Crofts, New York, S. 15

Gropp J. 1973

Wirkung von Antibiotika am Beispiel der Kälbermast.

Einfluß auf Wachstum und Futterverwertung (Pilotversuch).

Seminar f. Tierernährung, München, 8. Oktober 1973

Gross S.I. 1970

Specificities of steroid antibodies.

In: Immunological methods in steroid determination.

Péron F.G. and Caldwell B.V., Eds.

Appleton-Century-Crofts, New York, S. 41

- Gross S.I., Grant I.D., Bennett R., Wong S.L.R., Lomax P. 1971
Estriol - specific antibody for steroid assays.
Steroids 18, 555
- Hale W.H., Homeyer P.F., Culbertson C.C., Burroughs W. 1955
Responses of lambs fed varied levels of DES.
J. Anim. Sci. 14, 909
- Hennemann H.A., Rust R., Meites J. 1957
The effect of steroid hormones on fattening lambs.
J. Anim. Sci. 16, 283
- Henricks D.M., Dickey J.F., Hill J.R. 1971
Plasma estrogen and progesterone levels in cows prior
to and during estrus.
Endocrin. 89, 1350
- Hoffmann B., Karg H. 1971
Versuche zur Bestimmung von östrogenen Hormonen im
peripheren Rinderblut mit einem radioimmunologischen
Verfahren.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 152, 55
- Hoffmann B. 1972 a
Bestimmung von Östrogenen.
In: Fortschritte der Klinischen Chemie
Enzyme und Hormone.
Kaiser E., Ed.
Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, S. 491
- Hoffmann B. 1972 b
Determination of oestrogens in bovine peripheral plasma
by radioimmunoassay.
J. Endocr. 52, XVI

Hoffmann B. 1972

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind.
Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.
Habilitationsschrift, Fakultät für Landwirtschaft und
Gartenbau der Technischen Universität München

Hoffmann B., Karg H. 1973

Determination of tissue - levels of steroid - oestrogens
in the bovine using a radioimmunological technique.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 172, 44

Hoffmann B., Schams D., Giménez T., Ender M.L., Herrmann Ch.,
Karg H. 1973

Changes of progesterone, total oestrogens, cortico-
steroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma
around parturition with special reference to the effect
of endogenous corticoids and a prolactin inhibitor
respectively.
Acta endocr. (Kbh.) 73, 385

Hoffmann W., Forbes T.R., Westphal U. 1969

Biological inactivation of progesterone by interaction
with corticosteroid binding globulin and with albumin.
Endocrinology 85, 778

Huis in't Veld L.G., Jonkman van den Broek E.B., De Groot W.C.,
Laan C. 1967

Diaethylstilboestrol (DES) in wafels en lichaams-
vloeistoffen van mestkalveren.
Tijdschr. Diergeneesk. 92, 1272

Huis in't Veld, Jonkman van den Broek E.B., De Groot W.C. 1969 a
The concentration of oestrogenic substances in musculature
and organs of calves following injection of diethylstilb-
oestrol and hexoestrol.
Neth. J. vet. Sci. 2, 85

Huis in't Veld L.G., Jonkman van den Broek E.B., De Groot W.C.,
Cornel-Krüsel H.C. 1969 b
The concentration of substances with oestrogenic activity
in the musculature of the injection site and in urine of
calves given diethylstilboestrol and hexoestrol.
Neth. J. vet. Sci. 2, 171

Huis in't Veld L.G., Verdonk A.R., Kok G.L. 1971
The value of Tiecco's uterine weight test (1969/1968)
in examining foodstuffs and cattle feeds for oestrogenic
hormonoids.
(unveröffentlichte Ergebnisse)

Hurlock B., Talalay P. 1957
Enzymatic estimation of steroids in human urine.
J. Biol. Chem. 227, 27

Hurlock B., Talalay P. 1958
Enzymatic estimation of steroids in human urine.
Endocrinology 62, 201

Ittrich G. 1958
Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der östrogenen
Hormone im Harn.
Hoppe Seyler's Zt. physiol. Chem. 312, 1

Ittrich G. 1960
Eine Methode für die klinische Bestimmung der Harnöstrogene.
Zbl. Gynäk. 82, 429

- Jensen E.V., Suzuki T., Numata M., Smith S., De Sombre E.R. 1969
Estrogen-binding substances of target tissues.
Steroids 13, 451
- Jones H.E.H., Pope G.S. 1960
A method for the isolation of miroestrol from Pueararia
Mirifera.
J. Endocrin. 22, 303
- Jordan P.S., Jordan R.M., Croom H.G. 1955
Effect of stilbestrol, progesterone-estradiol implants
and oral administration of stilbestrol on fattening lambs.
J. Anim. Sci. 14, 936
- Jungblut P.W., Hätzl I., De Sombre E.R., Jensen E.V. 1967
Über Hormon "Rezeptoren". - Die oestrogenbindenden
Prinzipien der Erfolgsorgane.
18. Coll. d. Gese..schaft f. Physiol. Chemie, Mosbach
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 58
- Jungblut P.W., McCann S., Görlich L., Rosenfeld G.C.,
Wagner R., 1969
Binding of steroids by tissue proteins.
"Research on Steroids" Vol. IV
4th Meeting of the int. Study Group for Steroid Hormones,
Rome
Pergamon Press, Oxford 1970, S. 213
- Kahwanago I., Heinrichs W.L., Herrmann W.L. 1969
Isolation of oestradiol "receptors" from bovine
hypothalamus and anterior pituitary gland.
Nature 223, 313
- Kato J., Villee C.A. 1967
Preferential uptake of estradiol by the anterior
hypothalamus of the rat.
Endocrinology 80, 567

- Kato J., Atsumi Y., Inaba M. 1971
Development of estrogen receptors in the rat hypothalamus.
J. Biochem. 70, 1951
- Karg H. 1958
Untersuchungen an Gonaden, Nebennieren und Thymen über
einige endokrine Korrelationen, sowie deren Beziehungen
zum Wachstum.
Habilitationsschrift, Tierärztl. Fakultät München
- Karg H., Schaarschmidt, H., Waldschmidt M. 1970
Versuche zum Nachweis der illegalen Anwendung von
Diäthylstilböstrol bei männlichen Mastkälbern.
Archiv f. Lebensmittelhyg. 21, 1
- Karg H., Hoffmann B., Vogt K., Behr H. 1972
Radioimmunologische versus fluorimetrische Bestimmung
exogener und endogener Steroidöstrogene bei Mastkälbern.
Tierärztl. Umschau 27, 385
- Karg H. 1973
Lebensmittelhygienische Aspekte beim Einsatz von
Östrogenen in der Nutztiermast.
Archiv f. Lebensmittelhyg. 4, 77
- Kautsky M.P., Martin R.P., Janda V., Woolever C.A.,
Hagermann D.D. 1970
Analysis of free estrone and 17 β -estradiol in plasma by
tritiated sodium borohydride reduction.
Am. J. Obst. Gynec. 106, 447
- Kilkenny J.B., Sutherland J.E. 1970
The use of hormone administrations in commercial beef
production in the U.K.
Vet. Rec. 87, 734

Klostermann E.W., Cahill V.R., Kunkle L.E., Moxon A.L. 1955

The subcutaneous implantation of stilbestrol in
fattening bulls and steers.

J. Anim. Sci. 14, 1050

Korenmann S.G. 1969

Comparative binding affinity of estrogens and its relation
to estrogenic potency.

Steroids 13, 163

Korenmann S.G., 1970

Relation between estrogen inhibitory activity and
binding to cytosol of rabbit and human uterus.

Endocrinology 87, 1119

Korenmann S.G., Dukes B.A. 1970

Specific estrogen binding by the cytoplasm of human
breast carcinoma.

J. Clin. Endocr. 30, 639

Kuss E., Goebel R. 1972 a

Synthese von Antigenen mit Östrogenen als determinante
Gruppen.

In: Fortschritte der Klinischen Chemie

Enzyme und Hormone.

Kaiser E., Ed.

Verlag d. Wiener Medizinischen Akademie, S. 519

Kuss E., Goebel R. 1972 b

Determination of estrogens by radioimmunoassay with
antibodies to estrogen - C6 - conjugates.

I. Synthesis of estrone-, estradiol-17 β - and estradiol-
albumin conjugates.

Steroids 19, 509

- Kyrein H.J., Hoffmann B., Karg H. 1973
Development of a radioimmunoassay for trenbolonacetate
and oestradiolbenzoate and characterization of both
compounds concerning their affinity to uterine oestrogen-
receptors.
J. Anim. Sci. 37, 256
- Leuthardt F. 1961
Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter & Co.-Verlag, Berlin, S. 657
- Lindner H.R., Perel E., Friedlander A. 1970
Antibodies to oestrogens.
Transaction 4th Meeting of the International Study Group
for Steroid Hormones, Rome, Dec. 1969.
Research on Steroids.
Finkelstein, M., Conti C., Kloppe A., Eds.
Pergamon Press, Oxford 4, 197
- Lindner H.R. 1971
Diskussionsbeitrag.
Society for Endocrinology.
Cardiff, 12. - 16. September 1971
- Lindner H.R., Perel E., Friedlander A., Zeitlin A. 1972 a
Antibodies to steroids coupled to protein through ring B
and their use in the radioimmunoassay of gonadal hormones.
J. Endocr. 52, XVII
- Lindner H.R., Perel E., Friedlander A., Zeitlin A. 1972 b
Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation
to the site of attachment of the steroid hapten to the
peptide carrier.
Steroids 19, 357

- Loewe S., Spohr E. 1926
Nachweis und Gehaltsbestimmung des weiblichen Brunsthormons
in weiblichen Organen des Pflanzenreiches.
Sitz. Ber. Wien. Akad., Math. Naturw. Kl. 21.10.1926, S. 67
- Lorenz F.E. 1954
Effects of estrogen on domestic fowl and applications
in the poultry industry.
Vit. u. Horm. 12, 250
- Means T.M., Andrews F.N., Beeson W.M. 1953
The effects of hormones on the growth and fattening of
lambs.
J. Anim. Sci. 12, 176
- Mellin T.N., Erb R.E. 1965
Estrogens in the bovine - a review.
J. Dairy Sci. 48, 678
- Mellin T.N., Erb R.E., Estergreen V.L. 1965
Quantitative estimation and identifications of
estrogens in bovine urine.
J. Dairy Sci. 48, 895
- Mellin T.N., Erb R.E. 1966
Estrogen metabolism and excretion during the bovine
estrous cycle.
Steroids 2, 589
- Mercier-Bodard C., Alfsen A., Baulieu E.E. 1970
Sex steroid binding plasma protein (SBP).
In: Steroid assay by protein-binding.
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive
Endocrinology, 2nd Symposium.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 147, 204

- Mikhail G., Wu C.H., Ferin M., Van de Wiele R.L. 1970
Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol.
Steroids 15, 333
- Mills I.H., Schedl H.P., Chen P.S., Bartter F.C. 1960
The effect of oestrogen administration on the metabolism
and protein binding of hydrocortisone.
J. Clin. endocr. 20, 515
- Murphree R.F., Powell F.C., Bird J.M., Hobbs C.S. 1951
Effects of diethylstilbestrol on rate and economy of
gains in lambs and pigs.
Assn. South. Agr. Workers, Proc. 48 , 82
- Murphy B.E.P. 1964
Application of the property of protein binding to the
assay of minute quantities of hormones and other
substances.
Nature (Lond.) 201, 679
- Murphy B.E.P. 1967
Some studies on the protein binding of steroids and
their application to the routine micro and ultramicro
measurement of various steroids in body fluids by
competitive protein binding radioassay.
J. Clin. endocr. 27, 973
- Murphy B.E.P. 1968
Binding of testosterone and estradiol in plasma.
Canad. J. Biochem. 46, 299
- National Research Council 1966
Hormonal relationships and applications in the
production of meats, milk and eggs.
Supplement, National Academy of Sciences, Washington D.C.
Publication 1415

- Neill I.D., Johanson E.D.B., Datta I.K., Knobil E. 1967
Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle.
J. Clin. endocr. 27, 1167
- Niswender G.D., Midgley A.R. Jr. 1970
Hapten-radioimmunoassay for steroid hormones.
In: Immunological methods in steroid determination.
Péron F.G., and Caldwell B.V., Eds.
Appleton-Century-Crofts, New York, S. 149
- Nocke-Finck L., Breuer H. 1972
Produktionsraten und metabolischer Clearancerate von Östrogenen und Progesteron beim Menschen.
Referat, gehalten auf dem Methodenkolloquium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Hannover
- O'Donnell V.J., Preedy I.R.K. 1967
The oestrogens
In: Hormones in blood
Gray C.H., and Bacharach A.L., Eds.
Academic Press, London - New York, S. 142/143, 145/146
- Pearson A.M., Combs G.E. Jr., Wallace H.D., Sleeth R.B., Stroud J.W., Shepherd J.M., Koger M. 1962
The effects of stilbestrol implants in swine of different sexes.
J. Anim. Sci. 11, 251
- Pearson R.J. 1965
Secretion and metabolism of estrogens in the bull.
Ph. D. Thesis, Colorado State University

- Perry T.W., Stob M., Huber D.M., Peterson R.C., Beeson W.M. 1968
Resorcylic acid lactone for growing and finishing beef
cattle.
Purdue University, Cattle Feeders Day Report
19. April 1968
- Preston R.L., Burroughs W. 1960
Physiological actions of diethylstilbestrol in lambs fed
varying levels of protein and energy.
J. App. Phys. 15, 97
- Preston T.R., Gee I. 1957
Effect of hexoestrol on carcass and efficiency of food
utilization in fattening lambs.
Nature 179, 247
- Randel R.D., Brown B.L., Erb R.E., Niswender G.D., Callahan C.I.
1971
Reproductive steroids in the bovine.
II. Comparison of freemartins to fertile heifers.
J. Anim. Sci. 32, 318
- Randel R.D., Erb R.E. 1971
Reproductive steroids in the bovine.
VI. Changes and interrelationships from 0 to 260
days of pregnancy.
J. Anim. Sci. 33, 115
- Richterich R. 1971
Klinische Chemie
S. Karger Verlag, Basel - München - Paris - London -
New York - Sidney

- Roberts S., Szego C.M. 1946
The nature of circulating estrogens.
Lipoprotein-bound estrogen in human plasma.
Endocrinology 39, 183
- Roberts S., Szego C.M. 1953
Steroid interaction in the metabolism of reproductive
target organs.
Physiol. Rev. 33, 593
- Roberts S., Szego C.M. 1955
Biochemistry of the steroid hormones.
Ann. Rev. Biochem. 24, 543
- Robinson T.W., 1949
Oestrogenic potency of subterranean clover ; the
preparation and assay of extracts.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 27, 297
- Saez J.M., Morera A.M., Dazord A., Bertrand J. 1972
Adrenal and testicular contribution to plasma
oestrogens.
J. Endocr. 55, 41
- Sewell R.F., Warren E.P., O'Mary C.C. 1957
Effects of orally administered diethylstilbestrol
and a fermentation product on growing-finishing swine.
J. Anim. Sci. 16, 20
- Shemesh M., Ayalon N., Lindner H.R. 1972
Oestradiol levels in the peripheral blood of cows
during the oestrous cycle.
J. Endocr. 55, 73

- Short R.V. 1962
Steroid concentration in normal follicular fluid and
ovarian cysts fluid from cows.
J. Reprod. Fert. 4, 27
- Skarzynski B. 1933
An oestrogenic substance from plant material.
Nature (Lond.) 131, 766
- Slaunwhite W.R. Jr., Lockie G.N., Black N., Sandberg A.A. 1962
Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol.
Science 135, 1055
- Snedecor G.W. 1956
Statistical methods.
The Iowa State College Press, Ames, Iowa, 5th ed.
- Stob M., Baldwin R.S., Tuite J., Andrews F.N., Gillette K.G. 1962
Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from
corn infected with Gibberella Zeae.
Nature 196, 1318
- Struempfer A., Burroughs W. 1957
The influence of growth hormone and diethylstilbestrol
on nitrogen retention in lambs.
J. Anim. Sci. 16, 1098 (Abstract)
- Sutherland E.W. 1972
Studies on the mechanism of hormone action.
Science 177, 401
- Svendson R. 1960
A double-isotopic derivative method for the quantitative
determination of oestrone and 17 β -oestradiol in plasma.
Acta endocr. (Kbh.) 35, 161

- Szadkowski D., Jürgensen A., Essing H.G., Schaller K.H. 1970
Die Kreatinineliminationsrate als Bezugsgröße für
Analysen aus Harnproben.
I. Einfluß der Harntagesmenge und des circadianen
Rhythmus auf die Kreatininausscheidung.
Z. klin. Chemie u. klin. Biochemie 8, 529
- Szego C.M., Roberts S. 1946
The nature of circulatory estrogens.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 61, 161
- Szego C.M., Roberts S. 1953
Steroid action and interaction in uterine metabolism.
Rec. Progr. Horm. Res. 8, 419
- Talalay P., Marcus P.I. 1956
Specificity, kinetics and inhibition of α - and β -hydroxy-
steroid dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 218, 675
- Taylor B., Catron D.V., Ashton G.C., Burroughs W. 1955
Stimulation in growing-finishing pigs by orally
administered stilbestrol with observations on the
development of certain organs.
J. Anim. Sci. 14, 1258
- Taylor B., Hale W.H., Burroughs W. 1957
Growth and fattening stimulation in ewe-lambs by certain
androgenic and estrogenic compounds.
J. Anim. Sci. 16, 294
- Velle W. 1958 a
Studies on oestrogens in cattle: the metabolic trans-
formation of oestrone to oestradiol-17a in the young calf.
Acta endocr. 28, 192

Velle W. 1958 b

Studies on oestrogens in cattle: urinary oestrogen excretion by the newborn calf.

Acta endocr. 29, 381

Velle W. 1958 c

Studies on oestrogens in cattle: the metabolic transformation of oestradiol-17 β to oestrone and oestradiol-17a in the young calf.

Acta endocr. 28, 186

Vogt K., Waldschmidt M., Karg H. 1972

Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und Rückständen von Östradiol beim Kalb nach intramuskulärer bzw. subcutaner Implantation von PräBlingen mit entsprechendem Östrogengehalt.

Arch. Lebensmittelhygiene 23, 70

Walker B.S., Janney J.C. 1930

Estrogenic substance.

II. An analysis of plant sources.

J. Endocr. 14, 399

Westphal U., Forbes T.R. 1963

Biological inactivation of progesterone by binding to alpha-1 acid glycoprotein (orosomucoid).

Endocrinology 73, 504

Westphal U. 1971

Effect of protein binding on hormonal activity of steroids.
In: Steroid-Protein Interactions.

Monographs on Endocrinology

Gross F., Labhart A., Mann T., Samuels L.T., Zander J., Eds.

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 434

- Wickersham O.E.W., Schultz L.H. 1964
Responses of dairy heifers to DES.
J. Anim. Sci. 23, 177
- Williams K., Henry D., Layne D.S., Collins D.C. 1968
Metabolism of 4-¹⁴C-17 β -estradiol-17a and 16-¹⁴C-
17a-³H-estradiol-17 β by the rabbit.
Endocrinology 83, 113
- Woehling H.L., Wilson G.D., Grummer R.H., Bray R.W., Casida L.E.
1951
Effects of stilbestrol and testosterone pellets implanted
into growing-fattening pigs.
J. Anim. Sci. 10, 889
- Wotiz H.H., Martin H.F. 1961
The simultaneous determination of progesterone,
oestradiol-17 β and oestrone in the plasma and other
body fluids of human females.
J. Biol. Chem. 236, 1312
- Wotiz H.H., Charransol G., Smith I.N. 1967
Gas chromatographic measurement of plasma estrogens
using an electron capture detector.
Steroids 10, 127

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg bin ich für die Überlassung des Themas, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut zu Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Herrn P.D. Dr. B. Hoffmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

L e b e n s l a u f

Hans Jürgen Behr	geb. 11. 9. 1943 in Aussig, als Sohn des Chemikers Dr. Franz Behr und seiner Ehefrau Annelies Behr, geb. Frank
Schulbildung	Volksschule in Waldmünchen von 1949 bis 1954 Staatl. Oberrealschule Cham von 1954 bis 1956 Goethe Oberrealschule Regensburg von 1956 bis 1964 Abschluß: Abitur
Militärdienst	Luftlandedivision, Fschjg. Btl. Nagold von 1964 bis 1966 Abschluß Leutnant
Studium	Ludwig-Maximilian-Universität München, Studium der Tiermedizin von 1966 bis 1971 Abschluß: Staatsexamen im November 1971
Bestellung als Tierarzt	7. Dezember 1971
Bisherige Tätigkeiten	wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan, von Januar bis Dezember 1972, gleichzeitig Anfertigung der vorliegenden Dissertation. Tätigkeit als praktischer Tierarzt bei Dr. G. Bolten, Itzehoe, im März und April 1972. Tätigkeit als Fleischbeschautierarzt am Schlachthof Freising, von April bis August 1973

